



## Tesis Doctoral

# **Análisis de nuevos marcadores moleculares de aplicabilidad clínica en el pronóstico del melanoma uveal: papel de la oncoproteína DJ-1, la senescencia celular y la comunicación microvesicular.**

María Santiago Varela

DEPARTAMENTO DE CIRURXÍA E ESPECIALIDADES MÉDICO-CIRÚRXCAS  
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIAS DA VISIÓN

FACULTADE DE MEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017







## AUTORIZACIÓN DO DIRECTOR / TUTOR DA TESE

Dna. M<sup>a</sup> José Blanco Teijeiro, Profesora Asociada de Ciencias da Saúde. Área de Oftalmoloxía. Departamento Cirurxía e Especialidades Médico-Cirúrxicas. Universidade de Santiago de Compostela.

Dna. María Pardo Pérez, Investigadora do Sistema Nacional de Saúde Miguel Servet no Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

D. Antonio Piñeiro Ces, Profesor Asociado. Departamento Cirurxía e Especialidades Médico-Cirúrxicas. Universidade de Santiago de Compostela.

Como Directores da Tese de Doutoramento titulada

« Análise de novos marcadores moleculares de aplicabilidade clínica no prognóstico do melanoma uveal: papel da oncoproteína DJ-1, a senescencia celular e a comunicación microvesicular.»

Presentada por Dna. María Santiago Varela, Alumna do Programa de Doutoramento en Ciencias da Visión, Departamento de Cirurxía e especialidades Médico-Cirúrxicas. Facultade de Medicina. Santiago de Compostela.

*Autorizan a presentación da tese indicada, considerando que reúne os requisitos esixidos no artigo 34 do regulamento de Estudos de Doutoramento, e que como Director da mesma non incurre nas causas de abstención establecidas na lei 40/2015.*

Fdo. Dna. M<sup>a</sup> José Blanco Teijeiro

Fdo.Dna. María Pardo Pérez

Fdo.D. Antonio Piñeiro Ces



Hay que correr, para abarcar la tierra, para que sea nuestra. Una lluvia cerrda la golpea,  
mojándola, hasta que ya no la vemos; y así, cuando se nos pierde, sabemos de pronto,  
que era nuestra.

Tierra sin mapa

Ángel Antonio Rama Facal

(Montevideo 1926- Madrid 1983)





*Para cinco bergantiñáns*





## Resumen

**Antecedentes:** El melanoma uveal (MU) es el tumor maligno intraocular más frecuente en la edad adulta. A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer en los últimos años, no se ha conseguido una mejor supervivencia de los pacientes con melanoma de úvea, debido, sobre todo, a la capacidad de metastatizar que presenta este tumor por vía hemática. Las metástasis hepáticas son la principal causa de muerte de estos pacientes; y pueden aparecer después de un largo período tras el diagnóstico y tratamiento, lo que nos hace pensar en la presencia de micrometástasis ocultas. En la actualidad la investigación en el melanoma de úvea se ha centrado en la identificación de factores moleculares que permitan establecer un pronóstico de la enfermedad tumoral.

### Objetivos:

- Caracterización funcional del papel de la oncoproteína DJ-1 en el MU.
- Análisis de los factores moleculares relacionados con la senescencia en el MU.
- Identificación y caracterización de nuevos marcadores moleculares presentes en microvesículas liberadas por líneas celulares de MU.

### Material y métodos:

El estudio funcional de la oncoproteína DJ-1 en líneas celulares de MU se realizó mediante el silenciamiento genético con siRNAs con el posterior análisis de expresión, proliferación e invasión celular a tiempo real. El análisis de senescencia celular se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica en un estudio retrospectivo en casos enucleados de MU en la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto (URQTIA) del servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Para

la caracterización de microvesículas se realizó el aislamiento mediante ultracentrifugación a partir de secretomas de líneas celulares de MU con un posterior análisis proteómico.

#### Resultados:

El silenciamiento de la expresión de la oncoproteína DJ-1 inhibió la proliferación e invasión de células de MU en cultivo. Además la falta de expresión de DJ-1 aumentó la expresión del supresor tumoral PTEN y disminuyó la activación de la ruta AKT implicada en la supervivencia y proliferación celular.

El análisis de biomarcadores implicados en senescencia celular, p16, p21 y Ki67, mediante inmunohistoquímica en muestras de tejido tumoral de MU de globos oculares enucleados, respecto a la supervivencia global en los pacientes no mostró diferencias de supervivencia estadísticamente significativas entre los grupos con expresión positiva o negativa para estos marcadores. Sin embargo, la inmunorreactividad para PTEN se correlaciona con un peor pronóstico en cuanto a supervivencia global.

Finalmente la caracterización de microvesículas liberadas por las líneas celulares de MU permitió identificar la secreción de vesículas tipo exosomal cuyo perfil proteómico varía en función de las células de origen. Así se encontró que el proteoma exosomal de líneas primarias presenta un perfil proteico diferente que el de las líneas metastásicas. Se identificaron proteínas relacionadas con la proliferación, invasión y metástasis, con la angiogénesis, y varios antígenos de membrana con potencial valor pronóstico.



## Agradecimientos

Durante los años que han pasado desde que inicié esta tesis muchas personas han aportado su esfuerzo y trabajo para que haya podido salir adelante cada uno de los capítulos, éste ha sido un trabajo traslacional de verdad, donde hay una parte clínica y otra de investigación básica y han colaborado muchas personas de forma conjunta. Con el trabajo de esta tesis pude ver lo que era la investigación básica, como el motor de avance en la medicina.

Ha sido un honor haber podido formar parte del grupo de Tumores Intraoculares del Adulto del IDIS, gracias a mis directores de tesis, Marisé, Antonio y María, porque sé que el esfuerzo que han realizado para que esta tesis haya podido concluirse fue épico; porque siempre me han brindado su ayuda y amistad durante estos siete años. Gracias por haberme dado esta gran oportunidad. También quiero dar las gracias a la Prof. Capeáns por su confianza. Y a Manu Bande muchas gracias por haberme acompañado desde el principio en este proyecto.

Dentro del equipo de investigación básica quiero agradecer a todos los compañeros de los laboratorios de Endocrinología del IDIS, y sobre todo, a los del 3, Tamara, Nerea, Anxo, Lucía, Turo y especialmente a Diego, por todo el trabajo que pasaches cos experimentos, e porque sempre deches acougo cando xa parecía imposible que saíra algún resultado.

A Susana, de la Unidad de Proteómica del IDIS, gracias por tu ayuda, esfuerzo y preocupación por este trabajo.

Gracias a Manuel Collado y a Sabela por todo el esfuerzo con los cultivos y los estudios de senescencia.

Gracias al Prof. Tomás García-Caballero y a Patricia Viaño, porque fueron muchos cristales y muchas horas en el multicabezas, una parte importante de este trabajo ha sido gracias a vosotros.

Gracias a Andrés y a Rubén, por haber confiado en nuestras células y por esa imagen que ha sido el centro de esta tesis.

También quiero agradecer al equipo de Biostatech su trabajo estadístico.

Y del otro lado, el lado de la clínica, gracias a mis compañeros del Servicio de Oftalmología del Hospital de Conxo, por sus enseñanzas y sus ánimos durante todos estos años. Y también es muy importante dar las gracias por la colaboración, a quienes son el motivo de este trabajo, los pacientes de la Unidad de Tumores Intraoculares del Adulto del CHUS.

Ha habido durante todo este tiempo grandes amigos que han dado muchos consejos, ánimos y comprensión; a unos cuantos les tengo que dar las gracias: Carmen, Sonia, Diana, Zenaida, a las Rosas y Patris, Mari, Luisa, Olivia, Claudia, Silvia, María, André, Rafa...

Grazas a Chus por poñer a parte artística desta tese, por conseguir a idea perfecta a partir dunha imaxe. A Jorge por explicarme cómo vocalizar. E Nieves, a ti agradecerche a estadística, as explicacións dos tratamentos oncolóxicos...pero sobre todo grazas pola túa compañía nos momentos bos e malos.

E xa case para rematar o agradecemento para os cinco bergantiñáns a quen adico esta tese. A meu pai, por ensinarme a ler mapas, explicarnos como a Terra era redonda e o grande que era, porque sempre nos inculcaches a ilusión por “correr para abarcar la Tierra”. A miña nai por ensinarme a dividir por unha e moitas cifras, por mostrarnos o valor do esforzo, e a xustiza. A miña irmá por ser o meu gran exemplo, porque todo o bo que coñezo é grazas a ti. A meu irmán o pequeno, que agora xa é moi grande, por ser o meu compañeiro en tódalas viaxes. Ó quinto bergatiñán, ó meu mellor amigo, gracias Leo por ensinarme a camiñar cos pés na terra. E por último, recordar a tódolos meus bergantiñáns, grazas por conformar a miña Terra sen mapa.

## Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
CI	<i>Cell index</i>
CD98 o 4Ff2	<i>4F2 Cell-surface antigen heavy chain</i>
BAAF	Biopsia-aspiración con aguja fina
BAP-1	BRCA1 proteína asociada 1
BrdU	<i>5-bromo-2-desoxiuridina</i>
BT	Braquiterapia
CDKIs	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitory proteins</i> (Proteínas inhibidoras de las quinasas dependientes de ciclinas)
CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
CEIC	Comité Ético de Investigación Clínica
CLTC	<i>Clathrin heavy chain</i>
COMS	<i>Collaborative Ocular Melanoma Study Group</i>
EF1G	<i>Elongation factor 1-gamma</i>
EF2	<i>Elongation factor 2</i>
EIF1AX	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A X-Linked</i>
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMP-1	<i>Extracellular matrix protein</i>
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERC	<i>Ezrin-Radixin-Moesin</i>

FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero fetal bovino)
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GADPH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GEP	<i>Gene Expression Profiling</i>
HCF-1	<i>Host cell factor-1</i>
H-E	Tinción Hematoxilina-eosina
He	Helio
HR	Hazard ratio
HSPA8	<i>Heat shock 70kDa protein 8</i>
I <sup>125</sup>	Braquiterapia Iodo 125
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
LCMPT	Lesión Coroidea Melanocítica de Pequeño Tamaño
MC	Melanoma de Coroides
MN	Melanocitos normales
MIA	<i>Melanoma-derived growth regulatory protein</i>
MU	Melanoma uveal
MSA	<i>Microsatellite analysis</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation dependent Probe Amplification</i>
Nd:YAG	<i>Neodymium-doped yttrium aluminium garnet</i>
NFR	<i>Nuclear Fast Red</i> (tinción con rojo nuclear)
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature Compound</i>
OGT	<i>O-linked N-acetylglucosaminetransferase</i>
OIS	<i>Oncogene-induced senescence</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)

PGK1	<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PMEL	<i>Melanocyte protein</i>
GDI2	<i>Rab GDP dissociation inhibition</i>
PTEN	<i>Phosphatasa and Tensin Homolog</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RR	Riesgo relativo
RT	Radioterapia
Ru <sup>106</sup>	Braquiterapia Rutenio 106
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
S-β-Gal	<i>Senescence-associated-beta-galactosidase</i>
SG	Supervivencia global
SEM	<i>Standard Error Mean (Error standard de la media)</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture</i>
SG	Supervivencia Global
SLE	Supervivencia Libre de enfermedad
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
SP90AB1	<i>Heat shock protein 90 kDa alpha (cytosolic), class B member 1</i>
TTT	Termoterapia transpupilar
THSB-1	<i>Thrombospondin-1</i>
URQTIA	Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto
VE	Vesícula extracelular



# Índice

Resumen .....	9
Abreviaturas .....	13
Introducción .....	23
1. Epidemiología del melanoma uveal.....	25
2. Fisiopatología del MU .....	27
3. Diagnóstico del melanoma uveal .....	30
3.1. Presentación clínica.....	30
3.2. Exploración oftalmológica y técnicas diagnósticas.....	30
3.3. Biopsia diagnóstica .....	31
4. Tratamiento local del MU.....	33
4.1. Radioterapia (RT).....	35
4.2. Terapia con láser.....	37
4.3. Cirugía.....	38
5. Factores pronóstico en el MU.....	39
5.1. Factores clínicos.....	40
5.2. Factores histopatológicos.....	41
5.3. Factores moleculares.....	43
6. Test de pronóstico genético .....	44
7. Alteraciones moleculares en el MU .....	51

8. Tratamiento sistémico del MU. ....	54
8.1. Tratamiento adyuvante.....	54
8.2. Tratamiento de la enfermedad metastásica .....	54
Capítulo 1: Papel de DJ-1/PARK7 en la patogénesis del melanoma uveal .....	59
1. Introducción.....	59
1.1. DJ-1/PARK7 .....	59
1.2. Papel de DJ-1 en procesos patológicos .....	61
1.3. DJ-1 en el Melanoma Uveal .....	64
2. Objetivo .....	67
3. Material y métodos .....	68
3.1. Cultivos celulares de melanoma uveal .....	68
3.2. Expresión proteica en líneas celulares mediante inmunodetección ( <i>Western-blot</i> ) .....	68
3.3. Silenciamiento DJ-1/PARK7 en líneas celulares de MU .....	72
3.4. Ensayos de proliferación a tiempo real .....	77
3.5. Ensayos de migración a tiempo real .....	78
3.6. Inmunocitoquímica .....	79
4. Resultados .....	80
4.1. Perfil de expresión de DJ-1 en las líneas celulares de MU.....	80
4.2. La inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 disminuye la proliferación de las líneas celulares de MU. ....	81
4.3. La inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 disminuye la invasión de las líneas celulares de MU. ....	85



4.4. La inhibición de la expresión de DJ-1 aumenta los niveles de PTEN y disminuye los de Akt. ....	86
5. Discusión .....	87
5.1. Silenciamiento de la expresión de PARK7/DJ-1 en cultivos celulares de MU.....	87
5.2. Papel de DJ-1 en la proliferación y migración en cultivos celulares de MU .....	88
5.3. Vía PTEN-Akt .....	92
Capítulo 2: Senescencia en MU .....	95
1. Introducción .....	97
1.1. Senescencia y cáncer .....	99
1.2. Senescencia en el MU .....	102
2. Objetivo .....	104
3. Material y métodos .....	105
3.1. Criterios de inclusión y exclusión .....	105
3.2. Técnica inmunohistoquímica (Ki67, p16, p21, PTEN y DJ-1) .....	106
3.3. Clasificación e interpretación inmunohistoquímica .....	107
3.4. Cultivo primario de células de MU humano .....	108
3.5. Tinción $\beta$ -galactosidasa .....	110
3.6. Análisis estadístico .....	111
4. Resultados .....	114
4.1. Características de la población .....	114
4.2. Análisis de la presencia de senescencia en el MU .....	116
4.3. El tratamiento previo no afecta a la intensidad de tinción de los marcadores de senescencia .....	120

4.4. Relación entre los distintos biomarcadores.....	121
4.5. Análisis de supervivencia e impacto de la presencia de marcadores de senescencia.....	122
4.6. Regresiones múltiples .....	125
4.7. Los cultivos primarios de MU y tejido fresco tumoral son positivos para $\beta$ -galactosidasa .....	126
5. Discusión .....	129
5.1. Expresión de los marcadores de senescencia en el estudio inmunohistoquímico.....	129
5.2. La intensidad de tinción de los marcadores de senescencia no muestra diferencias entre el grupo de pacientes con tratamiento previo vs sin tratamiento .....	131
5.3. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de los marcadores inmunohistoquímicos.....	132

### Capítulo 3: Caracterización del secretoma y proteoma de las vesículas extracelulares liberadas por el melanoma uveal ..... 137

1. Introducción.....	139
1.1. Proteómica aplicada al estudio del MU.....	139
1.2. Secretoma .....	142
1.3. Secretoma del melanoma uveal.....	144
1.4. Vesículas Extracelulares (VEs)-Exosomas:.....	145
1.5. Exosomas en melanoma uveal .....	148
1.6. Proteómica cuantitativa para el análisis del proteoma y secretoma-marcaje SILAC ( <i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i> ). .....	148
2. Objetivo .....	150

3. Material y métodos .....	151
3.1. Marcaje CILAR y SILAC .....	151
3.2. Aislamiento y caracterización de exosomas a partir de secretomas.....	154
3.3. Análisis proteómico.....	155
4. Resultados .....	160
4.1. El análisis proteómico de los secretomas de las células de melanoma uveal UM-A evidencia la presencia de un alto número de proteínas secretadas por la vía no convencional. ....	160
4.2. Las líneas celulares de melanoma uveal secretan microvesículas de tipo exosomal al medio de cultivo. ....	171
4.3. Análisis del proteoma de los exosomas secretados por las células UM-A .....	173
4.4. Análisis funcional de las proteínas identificadas en exosomas UM-A.....	175
4.5. Comparativa secretomas UM-A vs Exosomas UM-A .....	180
4.6. El análisis del proteoma de exosomas liberados por células de melanoma uveal metastásico muestra diferencias en función del lugar de metástasis.....	181
4.7. Los exosomas metastásicos presentan diferencias con los liberados por células del tumor primario.....	188
5. Discusión .....	192
5.1. Análisis proteómico de secretomas y exosomas de las células de melanoma uveal en cultivo .....	193
5.2. Análisis proteómico de los exosomas secretados por células de metástasis de melanoma uveal (cutánea y hepática).....	197

Conclusiones .....	203
Bibliografía .....	207
Anexo I .....	237
Anexo II .....	247





# Introducción

---





## Introducción

### 1. Epidemiología del melanoma uveal

El Melanoma Uveal (MU) es el tumor maligno intraocular primario más frecuente en la edad adulta; representa entre el 3-5% de todos los melanomas, lo que lo convierte en el melanoma más prevalente tras el cutáneo.<sup>1</sup>

Los MU se desarrollan a partir de los melanocitos uveales, que se originan embriológicamente en la cresta neural, como los melanocitos conjuntivales o los cutáneos; pero, a pesar de compartir con el melanoma cutáneo un mismo origen embriológico, el comportamiento clínico y las características de estos dos tumores son muy diferentes; desde sus características moleculares hasta la forma de diseminación metastásica.

Se trata de un tumor poco frecuente, siendo su incidencia de aproximadamente 4,3 casos nuevos por millón de habitantes al año,<sup>2</sup> aunque otras series cifran su incidencia entre 5 y 7,5 casos por millón de habitantes.<sup>3,4,5</sup>

Parece existir una incidencia más alta en el sexo masculino, con una tasa en los varones (4,9 casos por millón) en comparación con las mujeres (3,7 casos por millón).<sup>6</sup> Y en cuanto a la edad media de presentación, se ha descrito en torno a los 53 años;<sup>5,7</sup> incrementándose la incidencia con la edad.<sup>8</sup>

El MU es más frecuente en la raza caucásica, se ha descrito hasta 8 veces más riesgo que los afroamericanos. En un metaanálisis que estudiaba los factores de susceptibilidad individual al MU evidencia que en personas con iris claro y de piel clara, con poca capacidad para broncearse, presentaban mayor riesgo para el desarrollo del MU.<sup>5</sup>

El MU generalmente se produce de forma esporádica, pero se conocen diversos síndromes asociados a una frecuencia incrementada de MU: La *melanocitosis oculodérmica* (Nevus de Ota),<sup>9</sup> el *síndrome de melanoma familiar atípico con molas múltiples*,<sup>10</sup> la *neurofibromatosis tipo 1*<sup>11</sup> y el *síndrome de Li-Fraumeni*.<sup>12</sup>

La incidencia familiar de MU es muy rara, solo corresponde al 0,6% de todos los MU. Recientemente, las mutaciones germinales en el gen que codifica la proteína 1 asociada a BRCA-1 (BAP-1) se han descrito en pacientes con MU familiar; dicha mutación predispone también a la aparición de mesoteliomas, meningiomas y adenocarcinomas pulmonares.<sup>13</sup>

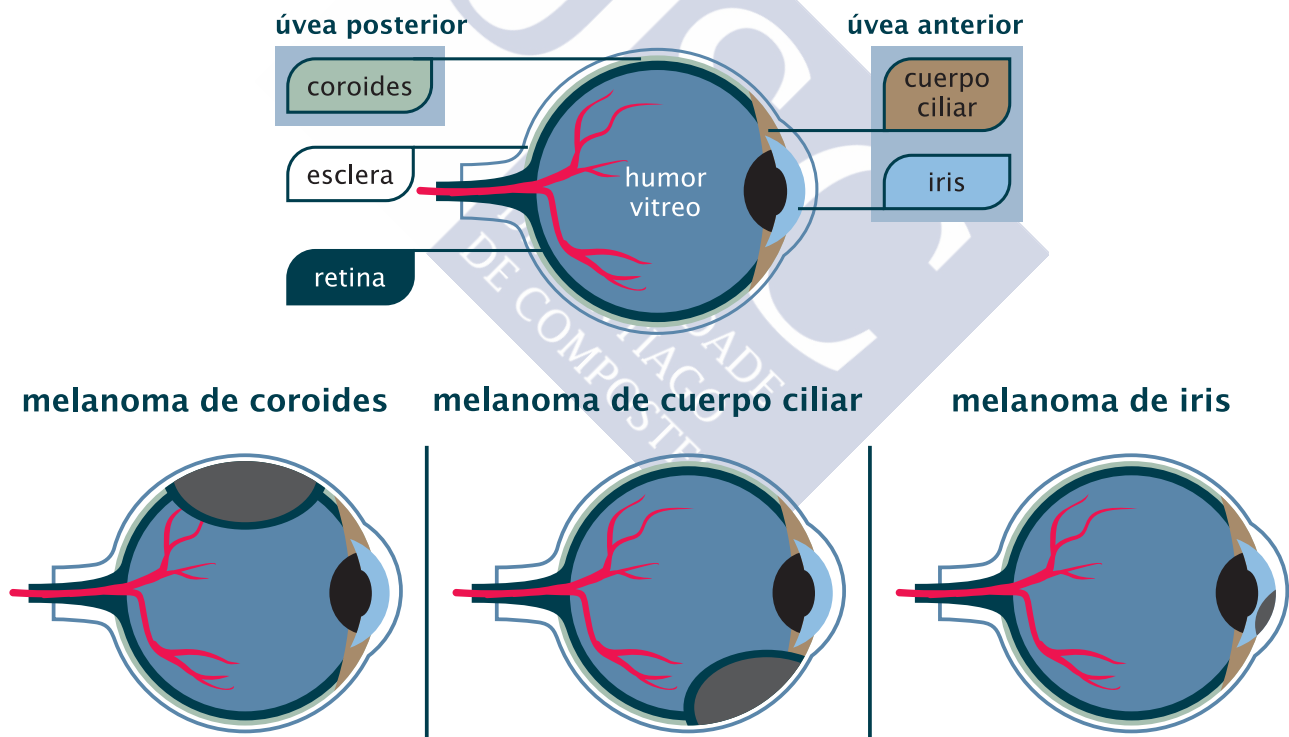


Figura 1. Localización anatómica de los melanomas uveales, modificada de Chattopadhyay *et al.*<sup>14</sup>



El MU deriva de las células melanocíticas de la úvea y tiende a metastatizar por vía hematógica.<sup>6</sup> Pero, en función de su localización anatómica, las características de estos tumores varían (Fig. 1) y también las actitudes terapéuticas. Así, el 80-90% de los MU se originan en la coroides (úvea posterior), mientras que los melanomas de cuerpo ciliar constituyen un 12%, y los de iris son raros.

Mientras que los melanomas de iris son los que presentan el mejor pronóstico, los melanomas de coroides (MC) y los melanomas de cuerpo ciliar se asocian a una peor supervivencia, debido sobre todo a su mayor tendencia a metastatizar por vía hematógica, preferentemente al hígado.

En los últimos años han aparecido importantes avances en el estudio del MU, sobre todo en cuanto a estudios genético-moleculares. Sin embargo, la supervivencia a largo plazo de los pacientes con MU no se ha visto mejorada. Hasta un 50% de estos pacientes desarrollarán enfermedad metastásica en los 15 años de seguimiento tras el diagnóstico y tratamiento del tumor primario. Y la supervivencia de los pacientes con metástasis es baja, con una media de 6-9 meses.<sup>15</sup>

La presencia de enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico se da en el 3% de los pacientes, pero a los 5 años puede llegar al 31% y a los 15 años al 50%. Hay que añadir, además, que las metástasis del MU son muy resistentes a la quimioterapia convencional.<sup>16</sup> Esta quimiorresistencia del MU a la terapia sistémica, junto con la hipótesis que sostiene la presencia de metástasis subclínicas previas al tratamiento local, podrían hacer pensar en la utilidad de un tratamiento adyuvante en este tumor en la fase de metástasis microscópicas o subclínicas.<sup>17,18</sup>

## 2. Fisiopatología del MU

Los MU se pueden desarrollar *de novo*, sin embargo, la mayoría de los MU se originan en un nevus preexistente.

Los nevus son tumores benignos compuestos por melanocitos sin características morfológicas de malignidad. La prevalencia del nevus coroideo se estima entre 0,2 y 30% en los estudios clínicos.<sup>19,20</sup>

Anatómicamente estas lesiones, al igual que los melanomas, se pueden clasificar en tres tipos según su localización: nevus de iris, cuerpo ciliar y coroides; cada uno de ellos presentan características diferenciadoras.

El nevus de iris son lesiones pigmentadas que afectan al estroma de esta región de la úvea, normalmente no ocasionan ninguna distorsión en la arquitectura del iris, aunque raramente pueden asociarse a un ectropión del esfínter pupilar. Los nevus del cuerpo ciliar son difíciles de diagnosticar debido a que su localización anatómica dificulta la visualización de la lesión.

Se ha estimado que 1 de cada 8845 nevus coroides se transformará en MU, con un pico durante la octava década de la vida, en la que 1 de cada 3238 nevus se convertirá en melanoma.<sup>21,22</sup>

El COMS define el nevus coroideo como lesiones melanocíticas de menos de 5 mm de diámetro basal y menos de 1 mm de altura.<sup>22</sup> En las publicaciones científicas actuales se emplean los términos de *Lesión Coroidea Melanocítica de Pequeño Tamaño (LCMPT)*, *nevus coroideo sospechoso* o *Tumor Coroideo Pigmentado Pequeño*; para hacer referencia a una lesión corioidea de pequeño tamaño (< 3 mm de altura, < 5 mm de base) en la que existe una duda razonable sobre su posible riesgo de crecimiento y/o malignización.

En los últimos años existe evidencia de que la detección temprana y el tratamiento de los melanomas de pequeño tamaño ofrece un mejor pronóstico que los melanomas grandes, por eso el gran interés en identificar los melanomas en un estadio temprano.

Shields *et al.* recogieron factores de riesgo clínicos que predicen el crecimiento de LCMPT, para la detección precoz del MU, los autores han empleando una regla mnemotécnica: ***'To Find Small Ocular Melanoma Using Helpful Hints Daily (TFSOM-***

**UHH)** para resumir los factores clínicos que definen el riesgo de transformación del nevus coroideo a melanoma coroideo (Fig. 2).<sup>23,24</sup>

En el primer trabajo de Shields *et al.* acerca de la transformación de nevus a melanoma, en 1997, se estudiaron 1329 pacientes con LCMPT, se describieron cinco factores predictivos: altura tumoral mayor de 2 mm, presencia de líquido subretiniano asociado, síntomas atribuidos a la lesión, pigmento naranja sobre la lesión, y margen tumoral inferior a 3 mm a la papila. Posteriormente, en 2009, en un estudio de 2514 pacientes, se añadieron 3 factores adicionales, que eran el vacío acústico posterior, la ausencia de halo y la ausencia de drusas.<sup>23,24,25</sup>

<b>To Find Small Ocular Melanoma Using Helpful Hints Daily</b>	<b>Thickness &gt; 2mm Fluid Sympto Orange Margin <math>\leq</math> 3 mm to disc Ultrasonographic Hollowness Halo absence Drusen Absent</b>	<b>Altura &gt; 2mm Líquido subretiniano Síntomas atribuidos a la lesión Pigmento naranja Borde tumoral <math>\leq</math> 3 mm del nervio óptico Vacío acústico en ecografía Ausencia de halo de despigmentación alrededor del tumor Ausencia de drusas sobre el tumor</b>
--	--	---

**Figura 2. Factores de riesgo para LCMPT**

Este estudio demostró que existe más de un 50% de posibilidades de transformación si tres de esos factores están presentes en un paciente. Con 1 ó 2 factores, el riesgo relativo para transformación de nevus en melanoma es de 3; con 3 ó 4 factores, 5; con 5 ó 6 factores, 9; y para lesiones con 7 factores, el riesgo es de 21. Además, la

combinación de altura superior a 2 mm, con margen del tumor en el disco óptico y la presencia de síntomas visuales tienen un riesgo de transformación maligna del 69%. Esta combinación de factores se considera la más grave para un paciente.<sup>25</sup>

### 3. Diagnóstico del melanoma uveal

#### 3.1. Presentación clínica

Muchos pacientes con MU refieren como primer síntoma una pérdida visual indolora o alteraciones visuales como metamorfopsias; los tumores grandes también pueden tener asociados desprendimientos de retina serosos, que pueden ir asociados a fotopsias.<sup>26</sup> Pero en algunos casos, los pacientes están asintomáticos y el diagnóstico de MU se realiza tras una exploración oftalmológica rutinaria.<sup>14</sup>

Los melanomas de iris a veces pueden ser percibidos por el paciente como una heterocromía, o pueden provocar glaucomas o inyecciones episclerales persistentes. Mientras que los melanomas de cuerpo ciliar pueden producir un astigmatismo por desplazamiento de la lente intraocular o el cristalino. Algunas veces un ojo ciego doloroso o un ojo con una catarata densa pueden esconder un MU.<sup>27</sup>

#### 3.2. Exploración oftalmológica y técnicas diagnósticas

En general se recomienda que los pacientes que presenten lesiones uveales sospechosas de melanoma deben ser valorados por especialistas en Oftalmología y expertos en Oncología Ocular. Los MU de tamaño mediano/grande pueden ser diagnosticados mediante oftalmoscopia directa y ecografía ocular hasta en un 99,7% de los casos.<sup>28</sup> En el caso de los melanomas de iris, el principal procedimiento diagnóstico es la observación mediante biomicroscopía, junto con la biomicroscopía ultrasónica (BMU).

La ecografía ocular es la técnica por imagen más útil para el diagnóstico del MU. Es aconsejable el uso de la ecografía en modo B y ecografía en modo A estandarizada.

Normalmente los melanomas presentan ecográficamente una reflectividad interna media-baja con una estructura interna regular, y muchos tienen forma cupuliforme, pero la forma “en champiñón” es bastante característica de estos tumores y ocurre cuando el tumor rompe la membrana de Bruch y crece en el espacio subretiniano.

La ecografía permite definir los cambios intraoculares producidos por el tumor, detectar la extensión extraescleral, realizar el diagnóstico diferencial con otras masas intraoculares; medir el tumor para determinar cuál es el tratamiento más adecuado, realizar el seguimiento del MU; e incluso la verificación de la colocación de las placas de braquiterapia.<sup>29</sup>

### 3.3. Biopsia diagnóstica

Aunque es rara la necesidad de una biopsia diagnóstica para confirmación del diagnóstico de MU, en ocasiones de duda diagnóstica, el experto en oncología ocular tendrá la necesidad de realizarla; sobre todo en casos de tumores amelanóticos, presencia de hemorragias vítreas densas asociadas, o cuando la ecografía no define el diagnóstico definitivo de MU. También ante la sospecha de metástasis ocular en un paciente sin diagnóstico de tumor primario extraocular. Es importante diferenciar la biopsia diagnóstica de la biopsia pronóstica (Fig. 3), empleada para el análisis citogenético y así poder establecer una estratificación del riesgo metastásico.

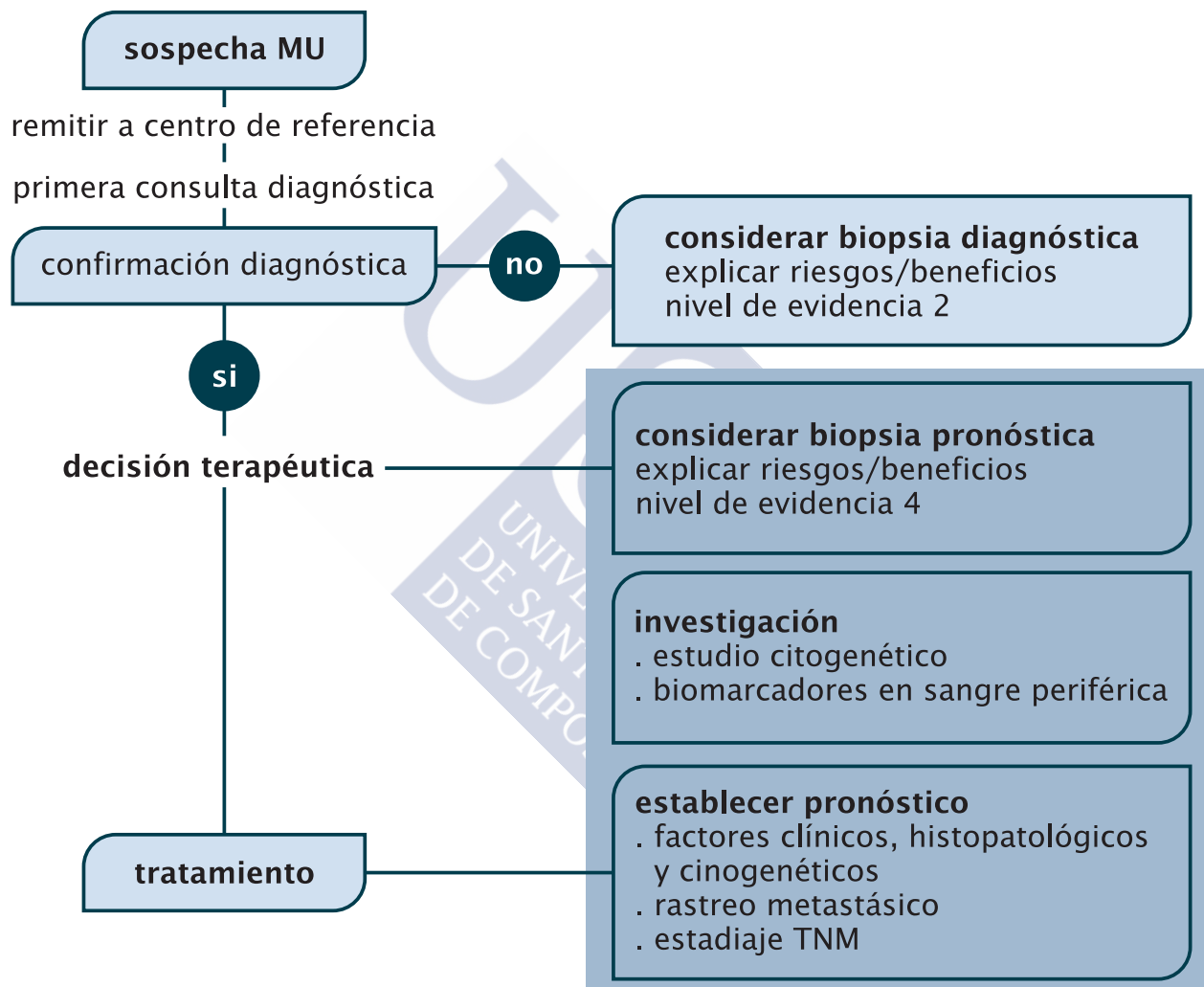
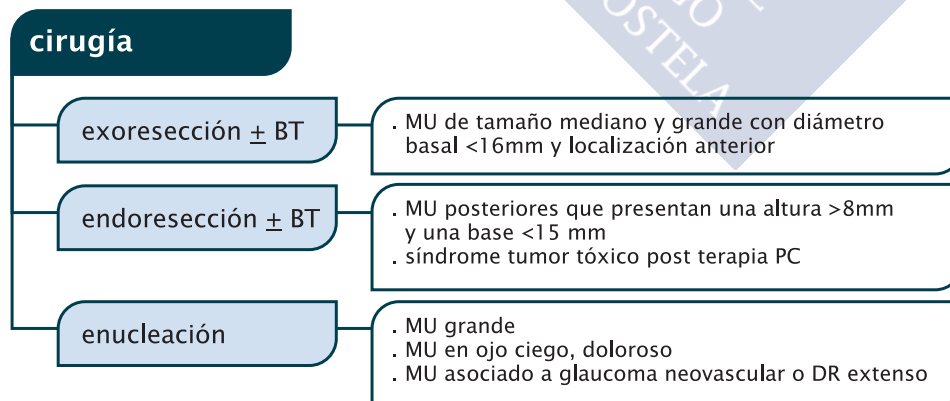
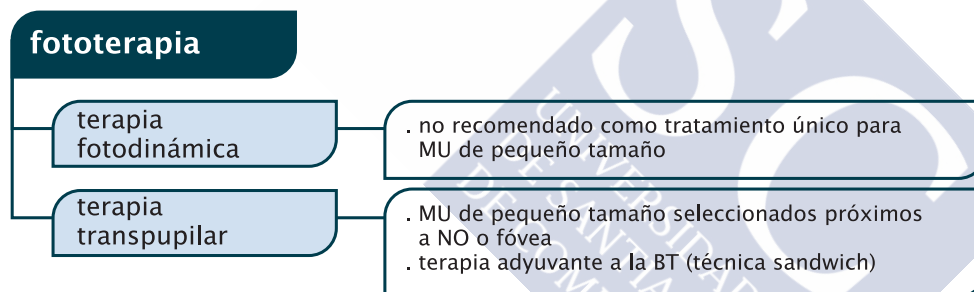
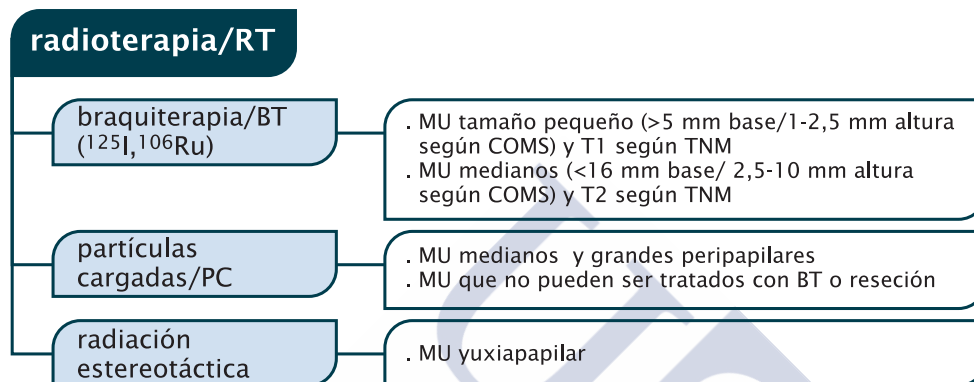


Figura 3. Algoritmo de actuación diagnóstica en MU Guía de Práctica Clínica la Sociedad Española de Retina y Vítreo 19. Melanoma Uveal.<sup>30</sup>

## 4. Tratamiento local del MU

En la primera parte del siglo XX, existía muy poca información sobre el MU, los pacientes se diagnosticaban cuando el tumor por su gran volumen causaba síntomas como glaucomas secundarios, dolor, proptosis o inflamación importante, lo que indicaba la enucleación del globo ocular; y estos pacientes presentaban un pronóstico vital malo.<sup>31</sup> Fue en la década de 1970 cuando surge la controversia alrededor del papel de la enucleación en los MU. Mientras que había autores que proponían la enucleación inmediata, otros proponían la observación del crecimiento de la lesión; esta discusión fue alimentada por la “Hipótesis de Zimmerman” que postulaba que el pico de presión intraocular en el momento de seccionar el nervio óptico durante la enucleación, podría causar la diseminación de células tumorales a través de las venas vorticosas a la circulación sistémica, favoreciendo la génesis de metástasis hepáticas.<sup>32</sup> Surge en este mismo período la búsqueda de técnicas alternativas a la enucleación, que permitan la preservación del globo ocular, incluidas la fotocoagulación láser, la cirugía de resección tumoral, y las técnicas de radioterapia.<sup>33</sup>

En 1985 y 1986 se diseñó el COMS (*Collaborative Ocular Melanoma Study*), un estudio prospectivo y multicéntrico, que aportó importantes contribuciones con respecto al diagnóstico y tratamiento del MU. Entre otros hallazgos, se demostró que la supervivencia era similar en pacientes con MU de tamaño mediano tratados tanto con braquiterapia<sup>125</sup> como con enucleación.<sup>34</sup>



**Figura 4. Indicaciones para el tratamiento del MU, modificado de MU Guía de Práctica Clínica la Sociedad Española de Retina y Vítreo 19. Melanoma Uveal** <sup>30</sup>



En la actualidad la elección de la terapia local en el MU depende de múltiples factores, como son el tamaño y la extensión del tumor, la edad del paciente y su estado de salud, el estado del ojo contralateral; y otros factores, entre los que se incluyen la decisión del paciente y su estado psicológico.<sup>33</sup> En la mayoría de los centros de oncología ocular las opciones de tratamiento incluyen radioterapia, enucleación, termoterapia transpupilar (TTT) y distintas formas de resección local (Fig. 4). A continuación se exponen algunos de los tratamientos:

## 4.1. Radioterapia (RT)

Es el método de tratamiento más extendido para el MC. La mayoría de los centros usan placas de braquiterapia, y en otros radioterapia con partículas cargadas (iones de He o haces de protones); estos métodos son equivalentes en cuanto a control local del tumor, pronóstico visual y pronóstico de supervivencia. En general, la RT se emplea cuando el MU es menor a 18 mm de diámetro e inferior a 12 mm de altura.<sup>33</sup>

### 4.1.1. Braquiterapia (BT):

La braquiterapia consiste en aplicar una fuente radioactiva en la base escleral del tumor, empleando placas epiesclerales con forma de cuenco con un diámetro que oscila entre los 12 y 20 mm, donde la parte interna contiene las fuentes radioactivas integradas en la placa, adheridas o en un molde; y la parte exterior está revestida de un metal pesado como oro; la placa presenta unos ojales para ser suturada a la esclera.

Se han usado diferentes isótopos, pero los dos más empleados son  $^{125}\text{I}$  y  $^{106}\text{Ru}$ . La mayoría de los centros emplean una dosis de radiación del 80-100 Gy en el vértice tumoral; por ello es importante la estimación de la altura tumoral mediante ecografía ocular, para poder calcular el tiempo de exposición.<sup>35</sup>

Se trata de la forma de tratamiento más extendida del MU con preservación del globo ocular.

Las indicaciones principales para este tratamiento incluyen los MU de tamaño mediano y pequeño según la clasificación del COMS (T1 y T2, siguiendo la clasificación TNM de *American Joint Committee on Cancer Staging of Uveal Melanoma*). Los criterios de exclusión serían: tumores con extensiones extraoculares >5 mm o estadio T4e; y ojos dolorosos sin percepción visual.<sup>36,37</sup>

#### 4.1.2. Radioterapia con partículas cargadas:

La radiación se libera en forma de protones, iones de He o de C, que están cargados eléctricamente y de forma masiva, lo que permite que penetren en el organismo del paciente, liberando la radiación en el área correspondiente al tumor y con una desaceleración muy rápida (pico Bragg). Previa a la radiación es necesario llevar a cabo una intervención quirúrgica, en la que empleando transiluminación vía pupilar, se colocan cuatro anillos de Ta radiopaco de 2,5 mm de diámetro, suturados a la esclera alrededor de los bordes del tumor. Estos anillos servirán de puntos de referencia para ajustar la dirección del haz de partículas cargadas en el momento del tratamiento.

Esta forma de tratamiento conservador estaría indicado para MU grandes, de hasta 15 mm de altura, peripapilares (aunque sirve cualquier otra localización) y sin desprendimiento de retina completo.<sup>38</sup>

#### 4.1.3. Radiación estereotáctica:

Se puede administrar mediante *Gamma Knife*, acelerador lineal (LINAC) o *ciberknife*. Se trata de una técnica novedosa para el tratamiento de tumores grandes no susceptibles de otras técnicas conservadoras del globo ocular, pero son necesarios estudios a largo plazo.<sup>39,40,41</sup>

## 4.2. Terapia con láser

### 4.2.1. Termoterapia transpupilar (TTT):

Consiste en aplicar láser infrarrojo (810 nm) en la superficie del tumor a través de la pupila dilatada, con la finalidad de inducir hipertermia y necrosis del tejido tumoral hasta un máximo de 4 mm de espesor.

La terapia con láser diodo ha sido bien tolerada, pero la tasa de recidivas locales es alta, aproximadamente un 20% de los casos.<sup>42</sup> Se puede emplear en tumores de pequeño tamaño próximos a mácula o nervio óptico; ya que la tasa de control de los tumores tratados con TTT desciende a medida que aumenta su tamaño. Su uso más frecuente, y casi el único aceptado por la comunidad internacional en la actualidad, es como tratamiento adyuvante a la braquiterapia (“técnica en sándwich”).<sup>43,44</sup>

### 4.2.2. Terapia fotodinámica:

Este tratamiento se basa en la fotooxidación, trombosis y necrosis del tejido inducida por un agente fotosensibilizante, que se localiza en células o tejidos que al ser iluminados con una luz de determinada longitud de onda y en dosis suficiente, dichas células son destruidas. Es capaz de inducir el cierre de la vascularización superficial, pero no de inducir la destrucción completa del tumor. Por lo tanto este tratamiento no está recomendado como tratamiento único del MU de pequeño tamaño.<sup>30,45</sup>

## 4.3. Cirugía

### 4.3.1. Exorresección:

La técnica más empleada para resección *ab externo*. En la actualidad, es la esclerouvectomía *lamelar parcial*, en la que se realiza un colgajo escleral superficial suprayacente al tumor, una vitrectomía vía *pars plana* para producir una descompresión limitada ocular; y se sigue con una escisión en bloque de la masa tumoral con el colgajo escleral lamelar profundo, para realizar la sutura del colgajo superficial, asociado a una vitrectomía completa, y BT. <sup>30</sup>

Es un procedimiento de alta complejidad técnica, reservado para tumores en ojos con posibilidad de mantener parte de la función visual, que presenten una gran altura (8-10 mm) y una base de implantación relativamente pequeña (<15 mm), de localización anterior y cuadrantes nasales; en los que la BT tiene una alta tasa de complicaciones. <sup>30</sup>

### 4.3.2. Endorresección:

Es la técnica quirúrgica para la extracción del MU vía *ab interno* empleando un vitrectomo mediante vitrectomía vía *pars plana*. La técnica quirúrgica varía en función de si existe o no invasión de la retina por el MU. En el caso de existir invasión es necesario realizar una retinotomía anterior de unos 120°, evertiendo la retina para trabajar directamente sobre el tumor. Hoy en día está demostrado que no se puede hacer sólo la cirugía. Hay que aplicar braquiterapia o haz de protones siempre, pero con la ventaja de dosis más bajas. <sup>46,47,48</sup>

Puede ser útil en tumores de localización posterior y altura >8 mm, donde la RT no está indicada por su alta tasa de complicaciones; y también en pacientes con ojo único donde se quiere conservar la visión. <sup>30</sup>

4.3.3. Enucleación:

Fue la técnica de tratamiento más empleada en el pasado. En la actualidad es la segunda terapia local más empleada en el tratamiento del MU. Especialmente está indicada en tumores grandes (mayores de 18 mm de diámetro y/o mayores de 10 mm de altura), tumores con extensión extraescleral importante, tumores que rodean el nervio óptico, en el fracaso de tratamientos conservadores previos y en casos de ojos ciegos o dolorosos por glaucoma.<sup>33</sup>

5. Factores pronóstico en el MU

Se han descrito factores clínicos, anatomo-patológicos y en los últimos años, factores moleculares, que se correlacionan con el riesgo de desarrollar enfermedad sistémica (Tabla 1), lo que permite establecer un valor pronóstico de supervivencia de los pacientes con MU y establecer protocolos de seguimiento diferentes.

Factores de riesgo de enfermedad sistémica en MU		
Clínicos	Anatomía Patológica	Genómicos
Edad del paciente	Tipo celular	Pérdida del cromosoma 3
Género	Contaje mitosis	Ganancia del cromosoma 8
Altura del tumor	Diámetro medio de los nucleolos de diámetro mayor	Ganancia de 6p
Base del tumor	Presencia de patrones de matriz extravascular, particularmente 'loops cerrados'	Pérdida de 1p
Afectación del cuerpo ciliar	Densidad microvascular	<i>Gene Expression Profiling</i>
Crecimiento extraocular	Presencia y tamaño del crecimiento extraocular	
	Marcadores de proliferación celular tumoral	
	Densidad de los macrófagos infiltrando el tumor	
	Densidad de los linfocitos infiltrando el tumor	

Tabla 1. Factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad sistémica en el MU: factores clínicos, anatomo-patológicos y moleculares.

## 5.1. Factores clínicos

### 5.1.1 . Edad y sexo

Shields *et al.* llevaron a cabo un estudio retrospectivo de una serie de 8033 casos de MU en el que consideraron las características clínicas y el pronóstico vital según la edad de presentación. Encontraron que en comparación con los adultos mayores, los adultos jóvenes y de mediana edad presentaron una menor dimensión basal del melanoma y menor riesgo de metástasis y muerte relacionadas con el tumor.<sup>49</sup>

En cuanto al género hay estudios que encontraron una mayor tasa de metástasis en varones; mientras que el COMS no observó diferencias.<sup>50,51</sup>

### 5.1.2. Tamaño del tumor

El tamaño tumoral (el mayor diámetro basal y la altura) es uno de los signos clínicos más importantes como factor de riesgo en el pronóstico del MU.<sup>52</sup>

El COMS ha descrito que en los tumores grandes (>10mm de altura y >16 mm de diámetro basal), la mortalidad a los 5 y 10 años era del 28% y 40%; mientras que en tumores medianos (3,1-8 mm de altura y <16 mm de diámetro basal) la mortalidad era del 19 y 35%. Se ha descrito que por cada mm de altura adicional se incrementa un 5% el riesgo de metástasis.<sup>52</sup>

Dentro la última clasificación de AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) se relaciona el pronóstico de metástasis en función del diámetro basal y altura tumoral, clasificando el tumor en 4 categorías, siendo el riesgo de presentar metástasis a 10 años, 6% en T1, 20% en T2, 32% en T3 y 63% en T4.<sup>53</sup>

## 5.1.3. Extensión extraescleral

La presencia de extensión extraescleral se identifica en un 8,2-14,6% de los casos.<sup>54</sup> Se ha relacionado esta localización con tumores de mayor tamaño, con mayor frecuencia de monosomía 3, el tipo histológico epitelioides, con un alto índice mitótico y con ciertos patrones microvasculares.<sup>55,28</sup> La mortalidad a los 5 años en caso de presentar una extensión extraescleral pequeña (1-4 mm) se estima del 48% y si la extensión extraescleral es superior, esta cifra puede alcanzar el 78%.<sup>56</sup>

## 5.2. Factores histopatológicos

### 5.2.1. Tipo celular

Callender propuso inicialmente un sistema de clasificación para el MU incluyendo fusiforme A, fusiforme B, epitelioides, mixto, fascicular y tipo necrótico. Esto fue posteriormente modificado para incluir fusiforme A, fusiforme B, epitelioides y tumores mixtos.<sup>57,58</sup> La clasificación modificada de Callender mostró una mejor correlación entre el tipo celular del MU y su mortalidad.<sup>56</sup>

### 5.2.2. Actividad mitótica

La mayoría de los MU tienen un crecimiento lento, y generalmente aparecen escasas figuras mitóticas. Se ha descrito que los MU con una alta actividad mitótica, que se puede determinar con PC-10 y Ki67, se asocian a una disminución de la supervivencia.<sup>59</sup>

### 5.2.3. Tamaño de los nucléolos

Los nucléolos de las células de MU son llamativos con una simple tinción de H-E. Se ha descrito que los nucléolos grandes están asociados a un alto riesgo de metástasis.<sup>60</sup>

#### 5.2.4. Presencia de patrones de matriz extravascular, particularmente 'loops cerrados'

Aunque el estroma de los MU es escaso, se han descrito nueve patrones matriciales, que aparecen combinados en cualquier tumor. Varios de estos patrones se han asociado a un mayor riesgo de metástasis, la asociación más importante es la de bucles y, en particular la de las redes.<sup>61</sup> La presencia de redes vasculares (formadas por > 3 *loops*, asa vascular larga y cerrada) están relacionadas con una disminución de la supervivencia.<sup>62</sup>

#### 5.2.5. Densidad de microcirculación

Por otra parte, una densidad alta de la microcirculación en el MU se asocia con un peor pronóstico.<sup>63</sup>

#### 5.2.6. Marcadores de proliferación celular tumoral

En el MU se han empleado, sobre todo dos anticuerpos mediante técnicas de inmunohistoquímica para evaluar la proliferación celular: el antígeno nuclear de células proliferantes (ANCP) y el antígeno Ki67. Un número elevado de células inmunorreactivas se ha asociado con un mayor riesgo metastásico.<sup>64</sup>

#### 5.2.7. Infiltrado linfocitario y de macrófagos

Un 10% de los MU muestran cierto grado de infiltrado linfocitario. El aumento del número de linfocitos se asocia significativamente con el descenso de supervivencia.<sup>65</sup> Las células del MU con monosomía 3 pueden producir mediadores inflamatorios, que reclutan y activan a CD8 + y CD4 +. La activación de estas células producirá más mediadores inflamatorios generando un microambiente inflamatorio que favorecerá la progresión del MU.<sup>66</sup> De la misma forma un alto número de macrófagos en el MU se asocian con un



pronóstico desfavorable; para la determinación del infiltrado de macrófagos se puede realizar una IHQ con el anticuerpo CD68.<sup>67</sup>

## 5.3. Factores moleculares

El pronóstico vital de pacientes con MU está también muy relacionado con factores de riesgo moleculares, los cuales permiten identificar los casos que presentan mayor riesgo de metástasis. Para ello resulta imprescindible conocer la citogenética del MU y las vías moleculares que permiten el crecimiento tumoral y posibles vías de metastatización.<sup>33</sup>

### 5.3.1. Citogenética del MU

Los primeros estudios del cariotipo del MU con técnica de fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH), detectaron que la monosomía 3 y el incremento de copias del cromosoma 8q se encontraban con frecuencia en este tumor y se asociaban con el desarrollo de metástasis.<sup>68,69,70</sup> En el trabajo de Prescher *et al.* en 1996, se demostró que en los MU de ojos enucleados con frecuencia se presentaba la monosomía 3, y que el 50% de los pacientes con monosomía desarrollarían metástasis a los 3 años del tratamiento, comparado con la ausencia de enfermedad sistémica en aquellos pacientes que no presentaban esta alteración cromosómica.<sup>69</sup>

Más tarde, Kilic *et al.*, analizaron el cariotipo de 74 pacientes y los siguieron durante 43 meses para estudiar las principales alteraciones cromosómicas y su relación con la supervivencia. Describieron mutaciones en el cromosoma 8 (53%), cromosoma 6 (46%), y en el cromosoma 1 (24%); además confirmaron que la monosomía 3 y el diámetro mayor del tumor eran los factores más importantes para predecir una mala supervivencia.<sup>71</sup>

Aunque la alteración citogenética más destacable del MU es la pérdida del cromosoma 3, la ganancia del 8q o la pérdida del cromosoma 1p son otras de las alteraciones de mal pronóstico; mientras que la ganancia del cromosoma 6 es un indicador de buen

pronóstico en el MU. <sup>72,73</sup> En la tabla 2 se resumen las alteraciones cromosómicas más comunes en el MU y su frecuencia.

Cromosoma	Frecuencia
pérdida 1p	28-34%
ganancia 1q	24%
pérdida 3	50-61%
ganancia 6p	28-54%
pérdida 6q	35-37%
pérdida 8p	17-28%
ganancia 8q	36-63%

Tabla 2. Frecuencia de las anormalidades cromosómicas más comunes en el MU. Adaptado de *Clinical Ophthalmic Oncology-Uveal Tumors* por Damato y Singh; Springer Ed.<sup>74</sup>.

## 6. Test de pronóstico genético

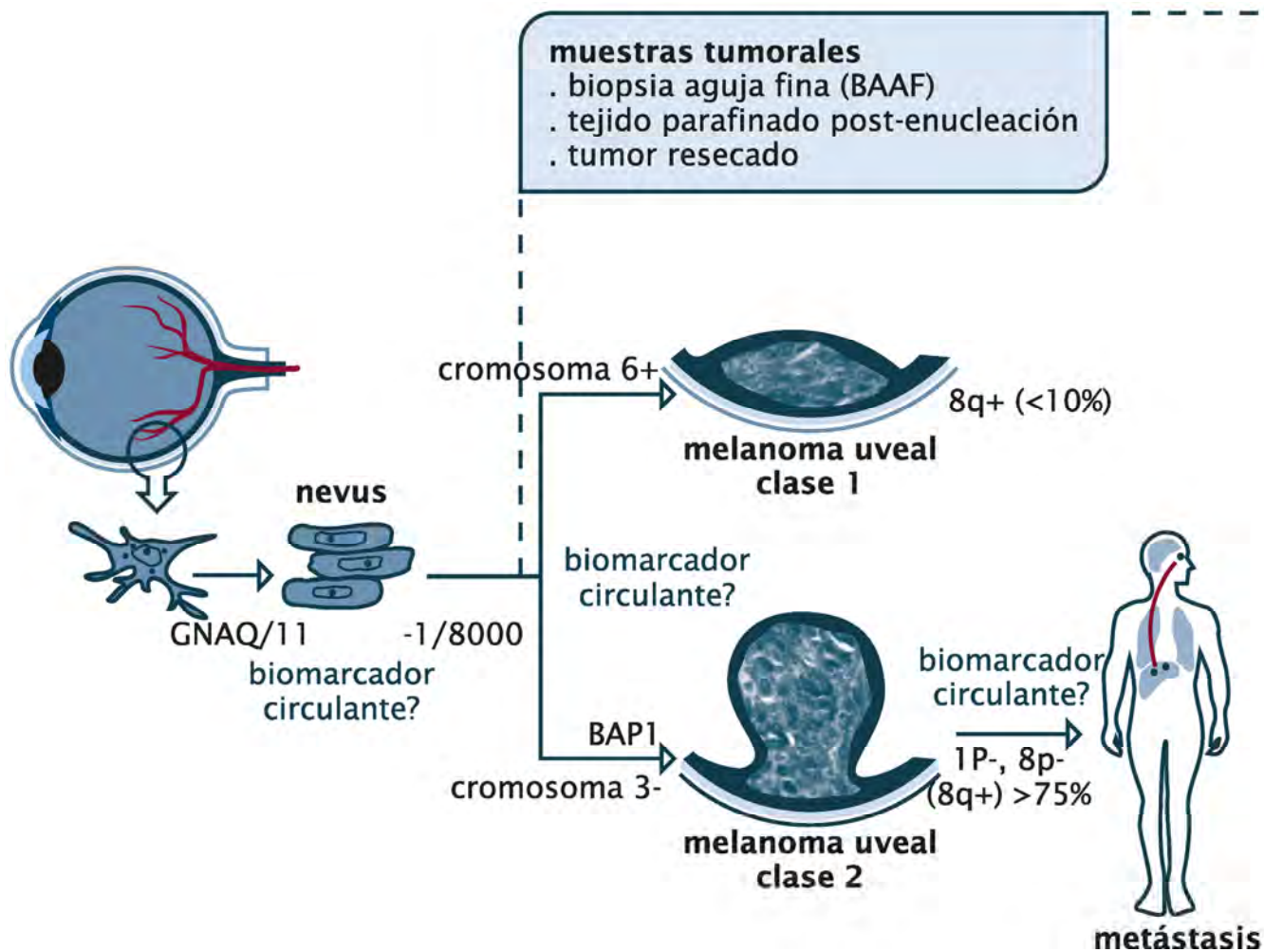
Recientemente se han descrito importantes avances en el conocimiento de la biología molecular de este tumor que han permitido realizar clasificaciones de los pacientes en cuanto al riesgo de presentación de metástasis. Así, en la actualidad existen dos test pronóstico:

- Test basado en el perfil de expresión génica (GEP “*Gene Expression Profiling*”), que ha sido patentado y comercializado para su uso en la práctica clínica (*DecisionDx-UM*; [www.castlebiosciences.com/test\\_UM.html](http://www.castlebiosciences.com/test_UM.html)) y en la actualidad se usa en la mayoría de las unidades de oncología ocular en EE.UU. <sup>75</sup>
- Test para las anormalidades cromosómicas basado en sondas multiplex (MLPA “*Multiplex Ligation dependent Probe Amplification*”), comercializado como SALSA MLPA (MRC-Holland; <http://www.mlpa.com>) y su utilidad en el pronóstico del MU junto con otros factores de riesgo ha sido ampliamente estudiada. <sup>76-78</sup>

En cuanto al perfil de expresión génica (GEP), se usa para el estudio molecular de 12 genes discriminativos y 3 genes control. La técnica emplea RNA mensajero extraído del tejido de MU que se convierte en DNA complementario y se marca para ser a continuación hibridado al *microarray*, donde cada secuencia de DNA complementario hibridará con el oligo correspondiente a la secuencia de su gen únicamente en el pocillo o posición en el que se encuentre el oligo específico. El revelado posterior mostrará qué grado de hibridación presenta cada gen. GEP divide los MU en tres tipos de tumores con distinto riesgo: la clase 1A representa a tumores con muy bajo riesgo (riesgo de metástasis del 2% a los 5 años), los tumores de clase 1B con bajo riesgo (riesgo de metástasis del 21% a los 5 años) y clase 2 con alto riesgo (riesgo del 72% a los 5 años).<sup>79</sup> También se ha descrito que los tumores clase 2 están asociados con mutaciones que inactivan la proteína asociada a BRCA-1, BAP-1, localizada en 3p21.<sup>80</sup> GEP puede usarse en tejido fijado en parafina pero la mejor forma de obtener células tumorales para la realización del ensayo es con la biopsia tumoral mediante PAAF en el momento de la enucleación o de la colocación de un placa de braquiterapia.<sup>81</sup>

La amplificación dependiente de sondas múltiples para la determinación de alteraciones en los cromosomas 1, 3, 6 y 8 (MLPA: *multiplex ligation dependent probe amplification*)<sup>82</sup> analiza la ganancia o pérdida del material cromosómico.<sup>83</sup>

En un estudio retrospectivo realizado por Damato *et al.* donde se realiza la tipificación citogenética con MLPA en 452 MU para correlacionarla con la presencia de otros factores de riesgo y con la probabilidad muerte, se encontró que los tumores sin monosomía 3 presentaban un riesgo mortalidad a los 10 años del 0%, un 55% en los que presentaban pérdida del cromosoma 3 sin ganancia del 8q, y un 71% en los que presentaban monosomía 3 y ganancia del 8q.<sup>77</sup> Para esta técnica puede emplearse tejido fresco congelado, tejido fijado con formaldehído y tejido parafinado; siendo preferible realizarse en muestras frescas congeladas.<sup>84</sup> Datos preliminares también han mostrado una buena correlación entre los resultados obtenidos con MLPA y MSA en biopsias intraoculares de MU que fueron posteriormente enucleados y re-examinados con estas mismas técnicas.<sup>85</sup>



metodo	alteración	estrategia	distribuidor
FISH	cromosomas 3, 6 y 8	sondas fluorescentes en DNA	varios
MSA	cromosomas 3, 6 y 8	análisis PCR microsatélites en DNA	varios
MLPA	cromosomas 1p, 3, 6 y 8 + 12 sondas de referencia incluyendo BAP-1	amplificación por PCR en DNA	SALSA MLPA MRC Holand (Netherlands)
GEP	perfil de expresión genética elevación de CDH1, ECM1, HTR28 y RAB31, disminución de E1F1B, FXR1, Id2, LMCD1, LTA4H, MTUS1, ROBO1, SATB1	expresión por PCR en mRNA	decision DX-UM castlebiosciences (EE.UU.)

Figura 5. Clasificación molecular del MU, adaptado de Melanoma Uveal, Guías de práctica Clínica de la SERV.<sup>30</sup>

Una ventaja de este último test pronóstico, es que la evaluación del DNA es más estable, más rentable económicamente y con mayor grado de efectividad y capacidad de predicción.<sup>33</sup> Un inconveniente del MLPA podría estar en relación con el procesamiento de muestras obtenidas de la biopsia-aspiración con aguja fina (BAAF) y la posible heterogeneidad genómica del MU.<sup>86,87</sup> Sin embargo, en estudios realizados en ojos enucleados por MU parafinados, a pesar de la heterogeneidad del tumor para algunos locus estudiados, se encontró una estabilidad del estado citogenético del cromosoma 3 a lo largo del tumor.<sup>87</sup>

Por otro lado, el análisis basado en GEP tiene la ventaja de que este test requiere poca cantidad de muestra para la obtención de resultados, aunque también tiene el inconveniente de la gran labilidad inherente al RNA.<sup>33</sup>

El uso de estos test pronóstico permite la clasificación de los tumores en grupos de riesgo de metástasis (Fig. 5 y 6), lo que posibilita realizar un protocolo de seguimiento de los pacientes y abre la puerta a un posible tratamiento adyuvante previo a la aparición de metástasis como se describe en la Figura 7; así Harbour *et al.* proponen el uso de tratamiento adyuvante en tumores de clase 2. Con el conocimiento de las alteraciones características de cada clase tumoral se podrían indicar estrategias terapéuticas dirigidas a distintas dianas en la enfermedad metastásica.<sup>88</sup>

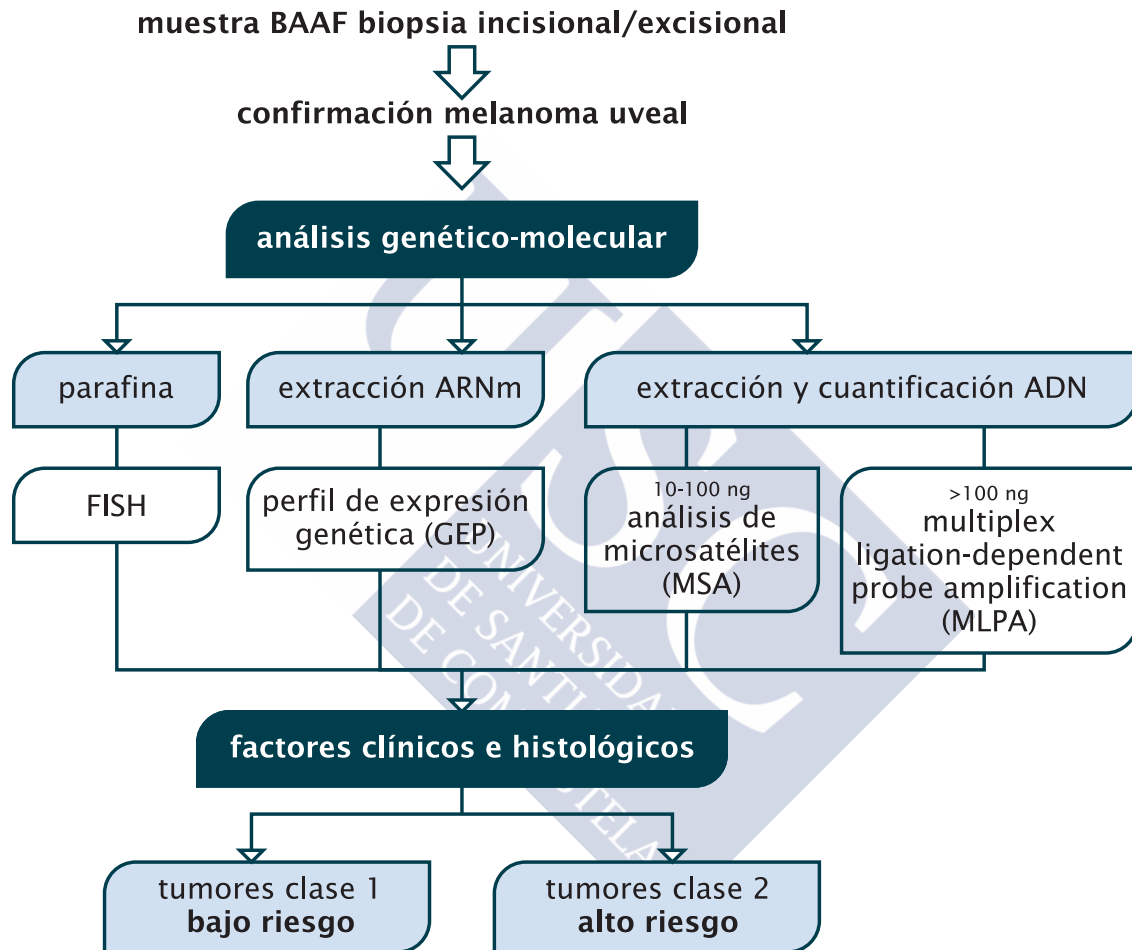


Figura 6. Protocolo en el procesado de muestra para el análisis molecular del MU. Adaptado de tesis doctoral de Angi, M.<sup>89</sup>

## diagnóstico y tratamiento del melanoma weal primario

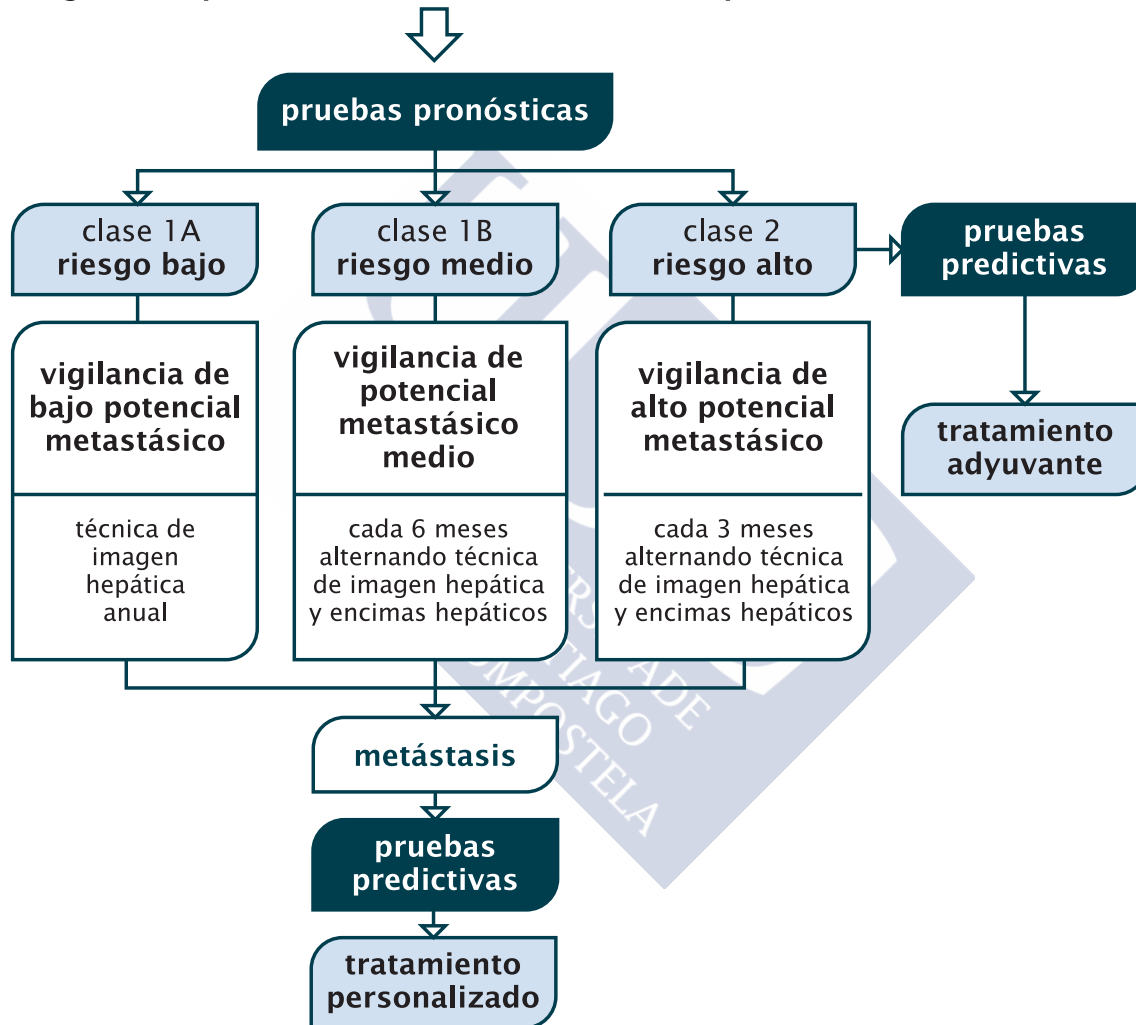


Figura 7. Diagrama de flujo para el seguimiento y actuación en los pacientes con MU en función de los resultados de GEP y la clasificación de riesgo del tumor, modificado de Field *et al.*<sup>88</sup>



## 7. Alteraciones moleculares en el MU

El enfoque terapéutico del MU ha comenzado a transformarse en los últimos años, desde la terapia local a la combinación de tratamientos locales y sistémicos, basados en la detección de las alteraciones citogenéticas y los eventos moleculares que permiten el desarrollo del melanoma y de la enfermedad metastásica (Tabla 3).

Alteraciones implicadas	Mecanismo	Cromosoma	Frecuencia (%)
<b>Proto-oncogenes</b>			
NRAS	Mutación	1p13	Rara
BRAF	Mutación	7q34	Rara
NSB1	Amplificación	8q21	50
MYC	Amplificación	8q24	43
DDEF1 (ASAP1)	Amplificación	8q24	50
GNAQ/GNA11	Mutación	9p21	>80
CCND1	Amplificación	11q13	65
MDM2	Amplificación	12q15	65
BCL-2	Amplificación	18q21	>95
<b>Genes supresores de tumores</b>			
LZTS1	Delección	1p13	-
CDKN2A-esporadico	Delección/mutación	9p21	Rara
CDKN2A-familiar	Delección/mutación	9p21	Rara
PTEN	Delección/mutación	10q23	15
BAP1	Mutación inactivante	3p21	0-84
<b>Alteraciones epigenéticas</b>			
CDKN2A	Hipermetilación	9p21	4-33
RASSF1	Hipermetilación	3p21.3	13-70
hTERT	Hipermetilación		52
<b>Alteraciones de MicroRNA</b>			
let-7b	Sobre-expresión	-	ND
miR18a	Sobre-expresión	-	ND
miR-199	Sobre-expresión	-	ND
miR495	Sobre-expresión	-	ND
miR549	Sobre-expresión	-	ND

Tabla 3. Alteraciones genéticas y epigenéticas descritas en MU. Adaptada de *Clinical Ophthalmic Oncology-Uveal Tumors* por Damato y Singh; Springer Ed.<sup>74</sup>

El MU es una neoplasia caracterizada por una baja tasa de mutaciones, lo que le confiere características específicas para su tratamiento sistémico.<sup>14</sup> Además, el perfil molecular del MU es diferente al que presenta el melanoma cutáneo o de mucosas,<sup>90</sup> caracterizados por una alta tasa de mutaciones; como las mutaciones de BRAF, V600E y NRAS.<sup>1</sup>

Entre los factores moleculares implicados en la génesis del MU o en el desarrollo de metástasis cabe destacar (Fig. 8):

- GNAQ/GNA11:

En más del 80% de los MU se han encontrado mutaciones oncogénicas en la subunidad  $\alpha$  de la proteínas G asociadas a receptor, GNAQ o GNA11.<sup>91</sup> Esta mutación produce una activación constitutiva de la vía MAPK, y también está asociada a otras vías de crecimiento, como RAF/MEK/ERK.<sup>92,93,94,95,96</sup>

Existen evidencias que hacen pensar que las mutaciones en GNAQ/GNA11 son eventos tempranos en el desarrollo del MU, pero necesitan de mecanismos adicionales para el desarrollo del tumor y su capacidad de metastatización.<sup>81</sup>

- BAP1

El gen BAP1, se encuentra en el cromosoma 3p21 y codifica una enzima encargado de eliminar restos de ubiquitina individuales de diversos sustratos, incluidos BRCA 1, histona H2A, HCF-1 (*“Host cell factor-1”*) y OGT (*“O-linked N-acetylglucosminetransferase”*).<sup>81,97</sup>

En consonancia con su presunta función como un gen supresor de tumores, BAP1 experimenta la inactivación mutacional de una copia y la delección de la otra copia a través de la pérdida de todo el cromosoma.

La mutación que inactiva BAP1 fue encontrada aproximadamente en el 50% de los casos de MU; estando asociada a tumores metastásicos.<sup>98</sup>

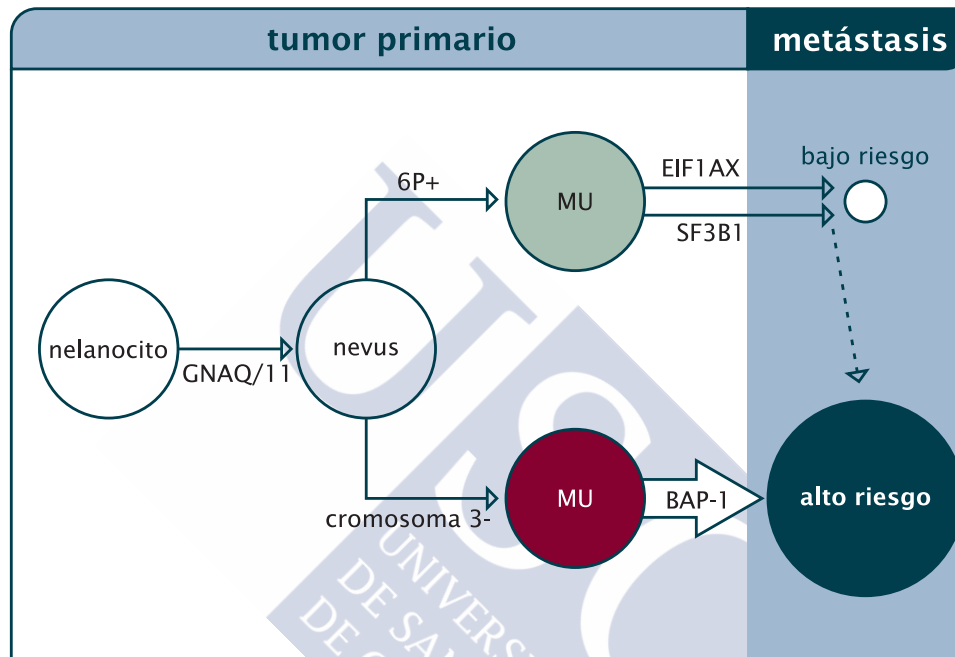


Figura 8. Factores moleculares implicados en la génesis del MU y en las metástasis. Modificada de Harbour *et al.*<sup>99</sup>

- SF3B1

Gen que codifica la subunidad 1 del factor 3B de splicing (*splicing factor 3B subunit 1*). Esta mutación define un subgrupo de MU con buen pronóstico.<sup>100</sup> A pesar de ello también se ha observado en metástasis hepáticas de MU.<sup>101</sup>

- EIF1AX

Es un factor de iniciación de la translación, al igual que SF3B1 está asociado a MU con buen pronóstico.

A pesar de su frecuencia, las mutaciones de SF3B1 o EIF1AX se encuentran sólo en un 3% de los MU con monosomía del cromosoma 3, y suelen ocurrir específicamente en MU con disomía 3, con rara presencia de metástasis. <sup>100,102</sup>

## 8. Tratamiento sistémico del MU.

### 8.1. Tratamiento adyuvante.

Desde los años 90, diversos fármacos como la Dacarbacina, la BCG (Bacilo de Calmette Guerin), el interferón o la fotemustina intraarterial han sido probados sin que haya podido objetivarse beneficios en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) o supervivencia global (SG).

Más recientemente, gracias a una mejor estratificación de los pacientes y a la aparición de nuevos fármacos como los agentes inmunoterápicos o los fármacos antidiaria se están llevando a cabo nuevos estudios. Sin embargo, a fecha de hoy carecemos de tratamientos sistémicos para reducción de recurrencia de la enfermedad.

### 8.2. Tratamiento de la enfermedad metastásica

#### 8.2.1. Tratamientos dirigidos al hígado

En pacientes con enfermedad oligometastásica se ha demostrado beneficio de la resección quirúrgica de las metástasis hepáticas en pacientes con MU, con una supervivencia global que supera los 12 meses. El inconveniente radica en que solo un 10% de los pacientes podrían beneficiarse de esta estrategia. <sup>103,104,105</sup>

## 8.2.2. Terapia sistémica

### Quimioterapia

Diversos fármacos quimioterápicos como la dacarbacina, la temozolamida o la fotemustina han sido probados con resultados muy pobres.<sup>106,107,108</sup> Esta resistencia intrínseca del MU a quimioterapia convencional obliga a buscar nuevas líneas de tratamiento.

### Inmunoterapia

Más recientemente, debido al desarrollo de los nuevos fármacos inmunoterápicos en el melanoma cutáneo, estos han sido también probados en el MU. Así, se han realizado estudios con fármacos antiCTL4, como ipilimumab o tremelimumab, aunque son estudios con pocos pacientes y la actividad de los fármacos era limitada en el MU.<sup>109</sup>

### Inhibidores de MEK

Se ha demostrado la disminución de la viabilidad celular con selumitinib, que es un inhibidor MEK1/2, fue correlacionado con un patrón de genes dependientes de MEK y con una disminución mayor en tumores con mutaciones de GNAQ o BRAF que en *wild-types*.





# Capítulo 1:

## Papel de DJ-1/PARK7 en la patogénesis del melanoma uveal

---







## Capítulo 1: Papel de DJ-1/PARK7 en la patogénesis del melanoma uveal

### 1. Introducción

#### 1.1. DJ-1/PARK7

DJ-1 es una proteína pequeña (20KDa) de la superfamilia de ThiJ /PfpI / DJ-1 compuesta por 189 aminoácidos cuya secuencia se mantiene conservada entre las células procariotas y eucariotas. La conformación estructural de DJ-1 muestra 7 hojas beta y 9 hélices alfa organizadas en forma de dímero (Fig. 9).<sup>111</sup> El gen que codifica para esta proteína, PARK7, se localiza en la parte distal del brazo corto del cromosoma 1 (1p36.12-1p36.33), donde se han descrito diversas alteraciones cromosómicas a nivel oncológico.

En condiciones normales, el DJ-1, se localiza predominantemente en el citoplasma y, en menor medida, en el núcleo y la mitocondria. En los humanos es una proteína ubicua y se encuentra ampliamente distribuida por distintos tejidos y órganos; se ha encontrado en páncreas, riñón, músculo, cerebro, hígado, testículos y corazón. Se ha descrito que DJ-1 funciona como un antioxidante, como una proteína chaperona sensible a reacciones redox, y como un regulador transcripcional protegiendo a las células del estrés oxidativo al modificar rutas de señalización que regulan la supervivencia celular.<sup>112</sup>

También a nivel ocular se ha descrito la presencia de DJ-1 en el endotelio corneal, donde se ha asociado al estrés oxidativo; así en la distrofia corneal de Fuchs se ha detectado una disminución de los niveles de DJ-1 que inducen apoptosis en estas células.<sup>113</sup>

Además se encuentra presente en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) donde también se encarga de regular el estrés oxidativo.<sup>114</sup>

Pero DJ-1 también es una proteína asociada al desarrollo de cáncer y a la enfermedad de Parkinson, que participa en diferentes rutas de señalización intracelular protegiendo a las células del estrés tóxico. Su expresión, oxidación, localización, y fosforilación están alteradas con frecuencia en tumores humanos; además se ha visto implicada en la transformación tumoral incluyendo la proliferación incontrolada, invasión, metástasis, y resistencia a la quimioterapia y apoptosis. A pesar de todas las evidencias que relacionan a PARK7 con el cáncer, los mecanismos a través de los cuales este oncogén promueve la supervivencia celular son poco conocidos.<sup>115</sup> En el caso de la enfermedad de Parkinson, se ha encontrado que el gen que codifica para esta proteína está mutada en formas raras de parkinsonismo de herencia recesiva.<sup>116</sup>

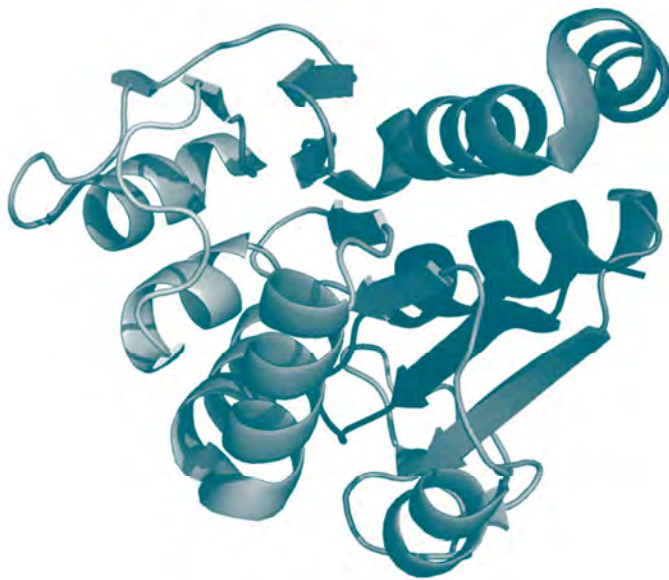


Figura 9. Estructura de la proteína DJ-1. Se muestra la estructura de DJ-1 compuesta de 7 láminas beta y 9 hélices alfa.

## 1.2. Papel de DJ-1 en procesos patológicos

La proteína DJ-1 ha sido descrita en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson y en otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Huntington; encontrándose la proteína DJ-1 en inclusiones tau de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.<sup>117</sup>

En concreto, en la enfermedad de Parkinson se ha descubierto que las mutaciones recesivas de PARK7 producen la pérdida de función protectora de esta proteína frente al estrés oxidativo; lo que conduce a la neurodegeneración.<sup>116</sup> Además en estudios con modelos animales de pez cebra se ha encontrado que al suprimir la expresión de PARK7 se aumentan los niveles de p53 y se produce la muerte de las neuronas dopaminérgicas, característica de la enfermedad de Parkinson.<sup>118</sup>

Surge una dicotomía en la acción del DJ-1; por un lado su acción en las enfermedades neurodegenerativas implica una muerte celular neuronal prematura, mientras que por otro lado en el cáncer ejerce el efecto contrario al favorecer la proliferación y crecimiento celular (Fig. 10).

En cuanto al carácter pro-oncogénico de DJ-1, este fue descrito por primera vez por su capacidad de transformar las células NIH-3T3 ya sea solo o en colaboración con otros oncogenes como c-Myc o H-ras.<sup>119,118</sup> En la actualidad, aunque la acción molecular de DJ-1 en tumores todavía no se conoce de forma exacta, hay indicios que hacen pensar que DJ-1 desempeña un papel en las líneas celulares de cáncer como protector contra el estrés,<sup>119,120,121</sup> afectando a la supervivencia celular mediante la modulación del estado de fosforilación de la proteína quinasa B (PKB) / Akt<sup>122,123,120</sup> que inhibe la ruta proapoptica DAXX-ASK1.<sup>124</sup> También se ha descrito que DJ-1 altera la actividad p53 a través de sumolización mediada por Topors,<sup>125</sup> y, tendría otra acción en la estabilización del regulador maestro transcripcional antioxidante Nrf2.<sup>126</sup>

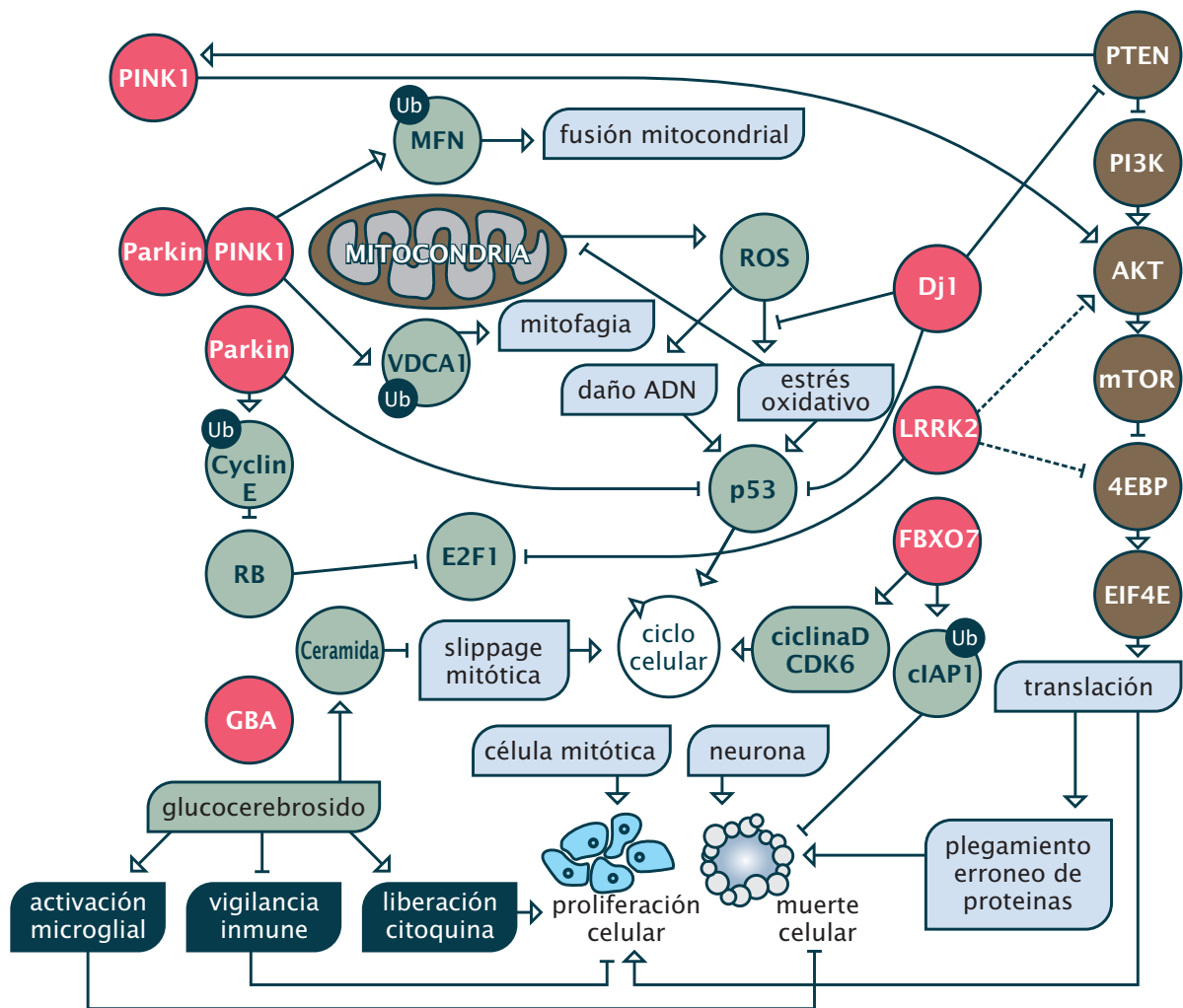


Figura 10. Vías de señalización comunes entre enfermedad de Parkinson y cáncer. Se muestra la dicotomía de la acción del DJ-1 en dos patologías con efectos contrarios, por un lado la muerte celular y por el otro la proliferación. Modificada de Devine *et al.*<sup>118</sup>

Debido a sus acciones en la promoción de la supervivencia y migración celular de las células tumorales (Fig. 11), se ha descrito a DJ-1 como un biomarcador en distintos tumores; así existen multitud de trabajos donde se han detectado niveles significativos de DJ-1 en tejido tumoral o a nivel circulante, en gran variedad de cánceres. Se ha correlacionado esta proteína con las metástasis linfáticas de tumores no microcíticos de pulmón;<sup>127</sup> aunque se ha detectado elevado en suero de pacientes con hipertrofia benigna de próstata, se encuentran niveles todavía más elevados en el carcinoma prostático.<sup>128</sup> Esta elevación también se describe en el suero y en la secreción del pezón en pacientes con cáncer de mama,<sup>129,130</sup> y en el suero de pacientes en el carcinoma pancreático.<sup>131, 132</sup> En el tumor laríngeo de células escamosas se ha detectado expresión elevada de esta proteína en estudios inmunohistoquímicos en tejido tumoral,<sup>121</sup> al igual que en tejido tumoral en el hepatocarcinoma;<sup>133</sup> y en estudios por inmunohistoquímica en tejido de tumores esofágicos se ha descrito como DJ-1 es un marcador de mal pronóstico en el carcinoma esofágico.<sup>123</sup>

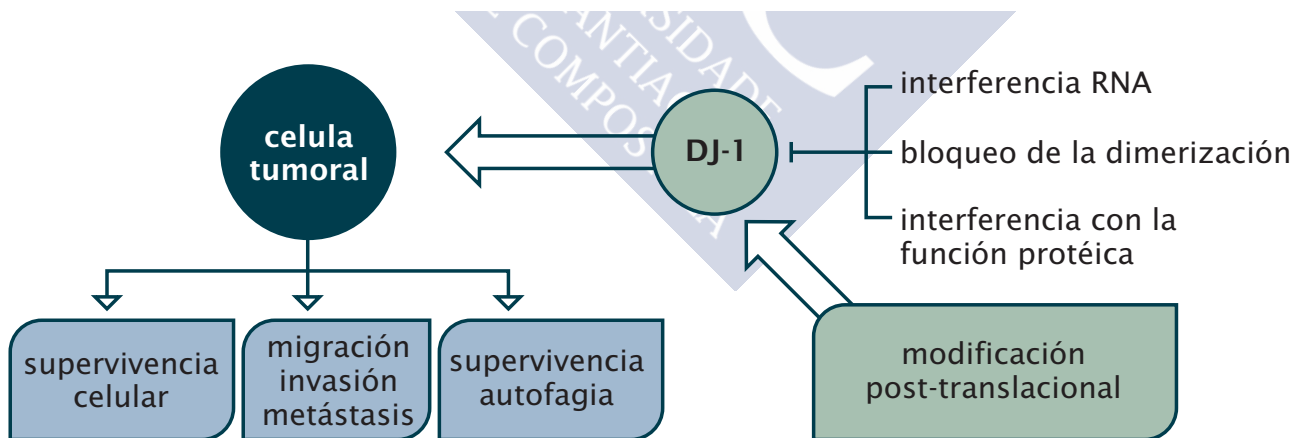


Figura 11. Acciones de DJ-1 en las células cancerígenas. Adaptado de Cao *et al.*<sup>115</sup>

### 1.3. DJ-1 en el Melanoma Uveal

Estudios proteómicos de Pardo *et al.* habían descrito la presencia de DJ-1 en el proteoma de cultivos celulares de MU, así como en el secretoma de estos mismos cultivos.<sup>134,135</sup> Posteriormente, estos mismos autores realizaron estudios en sangre de pacientes con MU, para la determinación de DJ-1 a nivel circulante; abriendo las puertas para su utilidad como un biomarcador no invasivo en pacientes con este tipo de tumor.<sup>136</sup>

Más tarde, trabajos de la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto (URQTIA) del Servicio de Oftalmología de Santiago de Compostela, cuantificaron mediante ELISA los niveles de DJ-1 en sangre de pacientes tanto con nevus coroideos como MU, comparándolos con una muestra de controles sanos. En este estudio, se ha encontrado que los pacientes con nevus coroideos que mostraban factores de riesgo pronóstico (sintomáticos, altura mayor de 1,5 mm, un diámetro basal mayor de 8 mm y presencia de excavación corioidea) presentaban niveles circulantes de DJ-1 mayores que aquellos pacientes con nevus corioideo sin estas características de riesgo (Fig. 12). Estas diferencias fueron también significativas al comparar los pacientes con estos factores de riesgo y los individuos control. De esta forma, se pudo concluir que los niveles elevados de DJ-1 en suero están asociados con factores clínicos de riesgo de transformación maligna en pacientes con nevus corioideo.<sup>137</sup>

En este mismo estudio, al realizar un análisis multivariante se ha observado que las concentraciones de DJ-1 tienen por sí mismas un valor predictivo independiente; y la posibilidad de que esta oncoproteína sea un biomarcador se reforzó al encontrar, en el seguimiento de tres pacientes con nevus y concentraciones séricas elevadas de DJ-1, la transformación del nevus en melanoma de coroides en un plazo entre 6 y 12 meses tras la detección de los niveles elevados de DJ-1.

Ante estos resultados, se pudo concluir que la proteína DJ-1 podría ser un marcador temprano de la transformación maligna de nevus coroideos. De hecho, en este trabajo, se encontró que la concentración sérica de DJ-1 empieza a aumentar en la etapa previa a la

transformación maligna de los nevus coroideos y que luego disminuye en estadios más avanzados. Se han propuesto varias explicaciones a este hecho como la que implicaría a DJ-1 en la etapa de transformación de nevus coroideo a melanoma, donde se produce una gran proliferación a nivel de la lesión, lo que conlleva un gran estrés celular que estimularía la producción de DJ-1 en esta fase. O que, al tratarse DJ-1 de una proteína implicada en la protección celular contra el estrés oxidativo, en la fase en la que el nevus alcanza una altura de 1,5-2 mm, este podría comenzar a producir estrés en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Este mecanismo de estrés crónico sería capaz de originar la sobreexpresión de DJ-1 tal y como se ha descrito en la DMAE seca.<sup>114</sup>

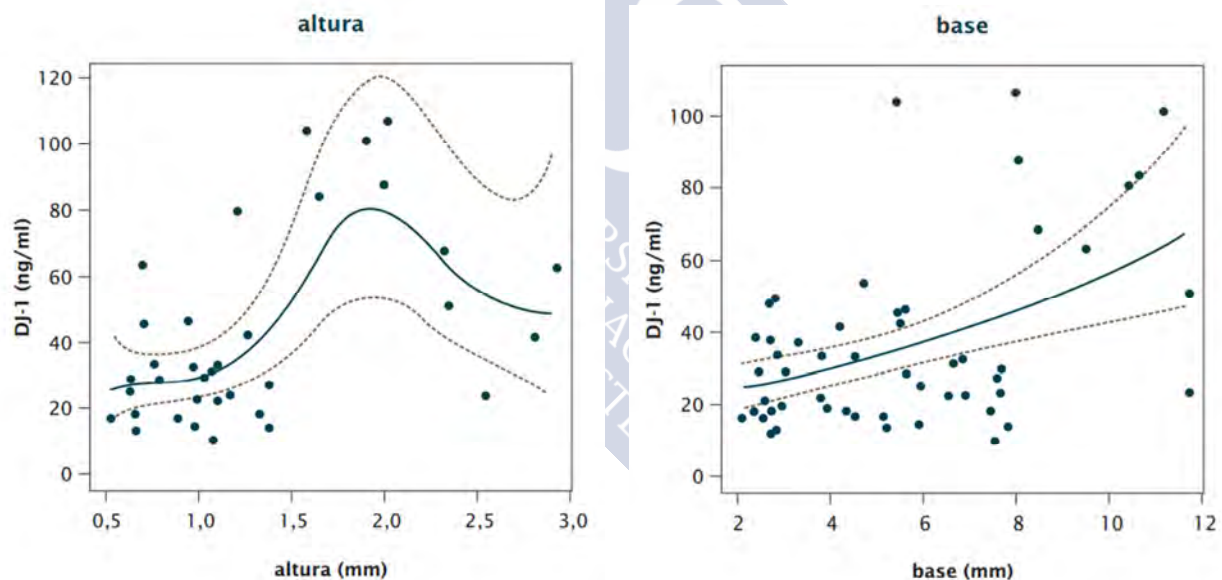


Figura 12. Niveles de DJ-1 circulantes y su relación con la altura y la base del tumor en el melanoma uveal. Se muestran los gráficos de estimación no paramétrica de la relación entre la concentración de DJ-1 en suero y la altura tumoral (izquierda), y DJ-1 y la base tumoral (derecha) en la línea continua, junto con el punto por punto de 95% de los intervalos de confianza en la línea punteada, modificada de Bande *et al.*<sup>137</sup>

En otro trabajo reciente en pacientes con MU, se sugiere a DJ-1 como un factor predictor de metástasis, al encontrarse niveles más elevados de esta oncoproteína en el suero de pacientes que desarrollaron metástasis frente a pacientes libres de enfermedad metastásica. En ese artículo, las curvas ROC relacionan mejor los valores de DJ-1 con la capacidad de detectar metástasis hepáticas en pacientes con MU que los marcadores clásicos de función hepática.<sup>138</sup> Sin embargo, los niveles de DJ-1 detectados por estos autores no se encuentran dentro de las concentraciones analizadas por el Kit de detección comercial utilizado, ni los valores del grupo control se corresponden con los valores previamente descritos por otros y nuestro grupo; por lo tanto, este resultado debe ser tomado con cautela.<sup>136</sup>





## 2. Objetivo

Pardo y colaboradores habían identificado la sobreexpresión y secreción de la oncoproteína DJ-1 en células de MU, y detectado su presencia a nivel circulante.<sup>136,134</sup> En los últimos años la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto (URQTIA) en Santiago de Compostela ha encontrado que los niveles elevados de DJ-1 en suero se correlacionaban con la presencia de factores de riesgo de transformación en nevus postulándose como un biomarcador temprano del MU.<sup>137</sup> Ante este contexto, se plantea hacer un análisis del papel de la proteína DJ-1 en las células de MU, y en especial en su acción en cuanto a la proliferación y migración en dichos cultivos.



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Cultivos celulares de melanoma uveal

##### 3.1.1. Mantenimiento de cultivos celulares

La línea celular UM-A establecida previamente por nuestro grupo, y las líneas SP6.5, OCM-1 y 92.1 establecidas por otros laboratorios (donadas por el Prof. Burnier, McGill University, Canadá) fueron cultivadas a 37°C y CO<sub>2</sub> 5% en *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM Life Technologies, CA, EEUU) con 10% suero fetal bovino (FBS) (SIGMA-ALDRICH, MO, EEUU), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL estreptomicina.

Cuando las células, que están sembradas en placas de 90 mm de diámetro alcanzan la subconfluencia (90-95%) son diluidas y resembradas para su mantenimiento. Se lavan primero con PBS y luego se despegan con tripsina diluida en PBS (Tampón fosfato salino) 1:1, dejándolas en el incubador durante 5 minutos, para luego ser recogidas y sembradas de nuevo en platos.

#### 3.2. Expresión proteica en líneas celulares mediante inmunodetección (*Western-blot*)

##### 3.2.1. Extracción de proteína total en células

Tras retirar el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS frío; los siguientes pasos se continuaron en hielo para evitar la degradación de la proteína. Se añadió a las células entre 100-500 µl de tampón de lisis RIPA con antifosfatasas y antiproteasas comerciales a una dilución 1/100 (Ref. P0044 y P8340. Sigma-Aldrich, MO, EEUU), que se incubó durante 30 minutos en hielo. Se despegaron las células con un

raspador estéril, y se pasaron a tubo Eppendorf para continuar con la homogenización celular mecánica automática utilizando un equipo *TissueLyser II* (Quiagen, Tokio, Japón).

Tampón de lisis RIPA:

- Tris pH 7,4 200mM
- NaCl 130 mM
- Glicerol 10%
- SDS 0,1 %
- Tritón X-100 1%
- $MgCl_2$  10 mM

Posteriormente se centrifugó el lisado celular a 1400 rpm durante 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante y conservándolo a -80°C.

### 3.2.2. Cuantificación de proteína

La cuantificación se realizó mediante el kit *RC DC Protein Assay* (Biorad, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

### 3.2.3. Preparación de la muestra

La cantidad total de proteína de la muestra usada variaba dependiendo del tipo de anticuerpo usado y la disponibilidad de muestra. Las cantidades totales se prepararon en el mismo tampón en el que están diluidas las muestras para obtener un volumen total de 20  $\mu$ L al que finalmente se le añadió 5  $\mu$ L de tampón Laemmli concentrado 5 veces

Tampón de Laemmli:

- SDS 10 % (p/v)
- Tris pH 6.8 400mM
- Glicerol 50%
- Azul de bromofenol 0,5%
- B-mercaptoetanol 5%.

Tras añadir el tampón, las muestras se hirvieron al baño María durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas; en el caso de que no se fueran a utilizar inmediatamente se almacenaron a -20 °C hasta su uso, volviendo a hervirse tras ser descongeladas.

#### 3.2.4. Electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Se separaron las proteínas en geles al 12% de bis-acrilamida. La electroforesis se realizó a voltaje constante de 70V. Como estándar de peso molecular se utilizaron patrones preteñidos (Invitrogen, Grand Island, New York, EEUU).

Tampón de electroforesis:

- Tris base 25 mM
- Glicina 192 mM
- SDS 0,1%

#### 3.2.5. Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, las muestras fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa (0,2 µm) mediante un sistema de transferencia húmeda en cassette (BioRad, CA, EE.UU). La electroforesis de transferencia se realizó a amperaje

constante (200 mA) durante 2 horas en frío. Tras la transferencia se lavó la membrana dos veces con PBS 1x para eliminar restos de metanol del tampón de transferencia.

Tampón de transferencia (1x):

- Tris 25mM
- Glicina 192mM
- Metanol 20%

### 3.2.6. Bloqueo de membranas e incubación de anticuerpo

Con el fin de disminuir la unión inespecífica del anticuerpo a otras proteínas, las membranas fueron bloqueadas en solución de bloqueo durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Se incubó después durante toda la noche a 4°C con el primer anticuerpo diluido 1:1000 en solución de bloqueo.

Al día siguiente se lavó el anticuerpo con tampón de lavado durante 1 hora, y se incubó en agitación con el segundo anticuerpo contra el primero, acoplado a peroxidasa alcalina, a una dilución 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se volvió a realizar un lavado con tampón de lavado durante 1 hora.

Tampón de bloqueo (caseína):

- Caseína 0,2%
- PBS 1x

Se calentó sin dejar hervir para disolver la caseína, después se añadió 0,1% de Tween-20.

Tampón de lavado:

- PBS 1x

- Tween-20 0,1%

### 3.2.7. Detección de proteína

Para la detección de proteína se indujo una reacción quimioluminiscente mediante la incubación con el sustrato *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, MA, EEUU). Para la visualización se utilizaron placas radiográficas *Mamoray* (Agfa Healthcare, Bélgica), que se revelaron utilizando la máquina reveladora XR 24 Pro (Dürr Dental, Alemania). Los tiempos de exposición fueron variables.

## 3.3. Silenciamiento DJ-1/PARK7 en líneas celulares de MU

### 3.3.1. Transfección de PARK7/ DJ-1 siRNA con lipofectamine

Se empleó para la transfección transitoria de las líneas celulares de MU un siRNA (*Small interfering RNA*) sintetizado químicamente como una doble hebra de RNA dirigido contra PARK7/DJ-1 *ON-TARGET pool siRNA* de Thermo Fisher Scientific (Dharmacon, Lafayette, CO, EEUU); como control en todos los experimentos se empleó un siRNA control *ON-TARGET pool non-targeting*. El vehículo empleado para la transfección transitoria fue Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Invitrogen, Grand Island, New York, EEUU); se realizó el protocolo de transfección siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 13).

### 3.3.2. Preparación de las células

Se prepararon las células 24 horas antes de la transfección para alcanzar una confluencia del 70-90%, cultivándolas en medio de cultivo libre de antibióticos. Para ello se calculó el número de células necesarias en función del diámetro del plato para los ensayos.

## 3.3.3. Preparación de los reactivos de transfección:

Se prepararon dos tubos:

Tubo 1, donde se diluyó la cantidad de Lipofectamine necesaria en medio Opti-MEM (Invitrogen, ThermoFisher, EEUU)

Tubo 2 donde se diluyó la cantidad necesaria de DNA/siRNA en medio Opti-MEM.

Se añadió la solución de DNA/siRNA sobre la solución de Lipofectamine, y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Solución 1	siRNA	5pMol
	Opti-MEM (siRNA)	25 $\mu$ L
Solución 2	Lipofectamine	0,5 $\mu$ L
	Opti-MEM (Lipofectamine)	24,5 $\mu$ L

**Tabla 4. Valores de siRNA Opti-MEM y Lipofectamine empleados para la preparación de las diluciones de transfección en pocillos de E-Plate (ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA, EEUU).**

## 3.3.4. Transfección:

Tras eliminar el medio de cultivo de los pocillos donde se habían sembrado las células el día previo a la transfección, se añadió el volumen adecuado de solución de transfección (en función del diámetro del pocillo) (Tabla 4). Se incubaron las células entre 6-8 horas a 37°C; pasadas estas horas se retiró el medio de transfección para minimizar la toxicidad del Lipofectamine y se reemplazó por medio de cultivo estándar libre de antibióticos.

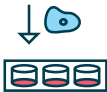






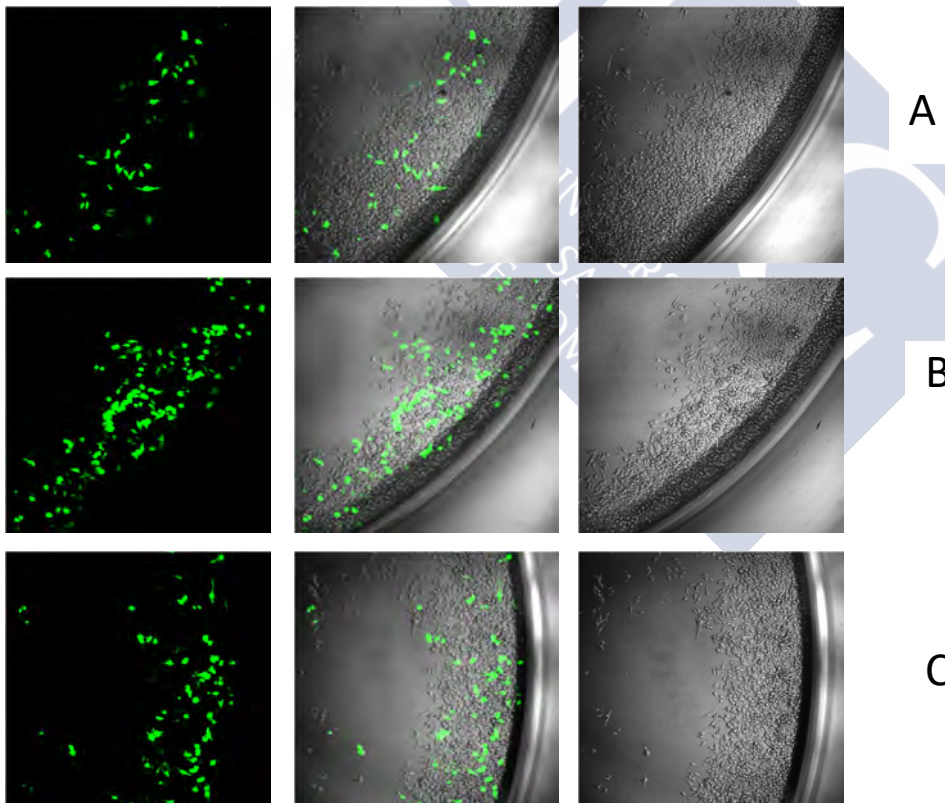
línea temporal			pasos
día 0	1		sembrar las células para alcanzar una confluencia 70-90% en el día de la transfección
	2		diluir Lipofectamine en Opti-MEM
	3		diluir DNA/siRNA en Opti-MEM
día 1	4		añadir la solución de DNA/siRNA a la de Lipofectamine
	5		Incubación
	6		añadir la solución de transfección a las células
día 2-4	7		análisis de los resultados en x CELLIGENCE

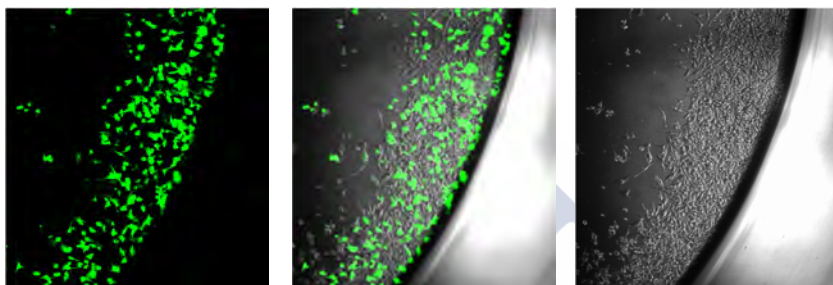
Figura 13. Protocolo de transfección: en la primera columna se muestran los tiempos necesarios para el proceso de transfección, y en la segunda se muestran los pasos realizados en el protocolo.



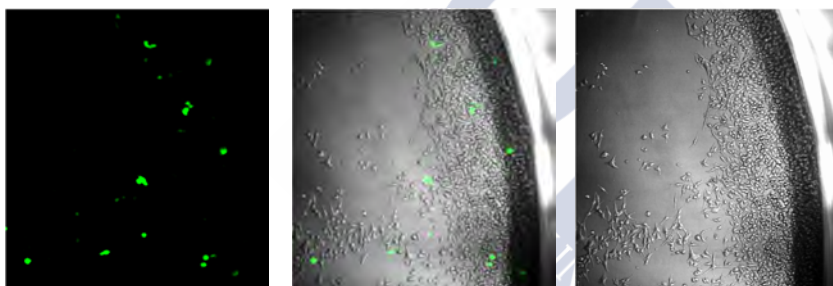
## 3.3.5. Optimización protocolo de transfección con GFP

Para poner a punto y estimar la eficacia de transfección se utilizó un plásmido de expresión para GFP (*Green Fluorescence Protein*) y así optimizar la cantidad de reactivo de transfección (Lipofectamine) y de siRNA necesarios. Se realizaron transfecciones a distintas concentraciones de plásmido y de Lipofectamine para determinar cuál era la relación de estos dos componentes que alcanzaba una tasa de éxito superior en porcentaje de células que adquieren el GFP. La relación óptima observada fue 1:5 DNA: Lipofectamine tal y como se observa en la Figura 14 D.

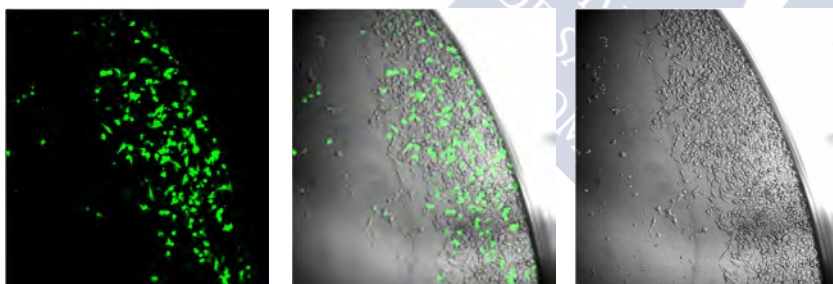




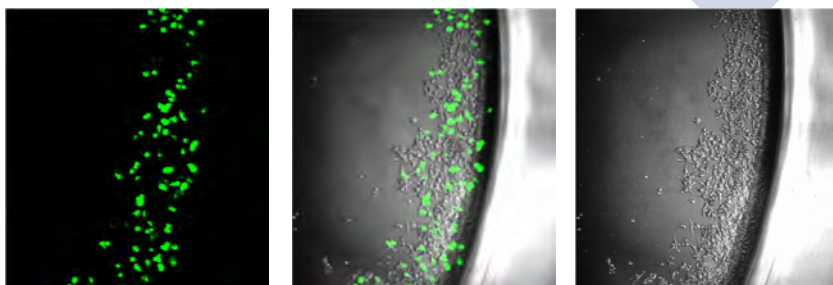
D



E



F



G

Figura 14. Optimización de transfección con GFP. Se muestran las distintas diluciones de los reactivos de transfección usando la proteína verde (GFP). El mejor ratio de Plásmido: Lipofectamine resultó ser 1:5 (D).

## 3.4. Ensayos de proliferación a tiempo real

Se realizaron ensayos de proliferación celular a tiempo real en un sistema xCelligence (ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA, EEUU) con las líneas celulares de melanoma uveal UM-A, SP6.5, 92.1 y OCM-1 comparando las células silenciadas para la expresión de PARK7/DJ-1 con las siRNA control. Para ello, se sembraron 7.500 células/pocillo en los platos comerciales del equipo (E-plate, ACEA Biosciences, Inc, San Diego, CA, EEUU) (Fig. 15), y a las 24 horas se añadió a cada pocillo la solución de transfección.

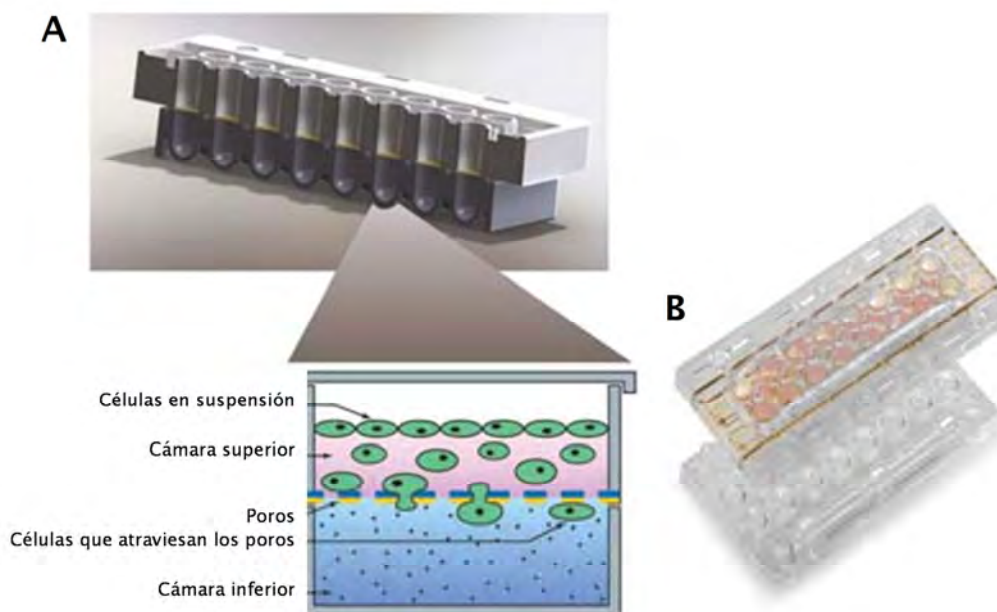
El sistema xCelligence tomará medición de la impedancia cada 15 minutos durante >72 horas. La impedancia se transforma por un logaritmo matemático en el índice celular (CI), dando una curva de CI frente a tiempo; esto permite extrapolar los datos de proliferación celular entre los dos grupos a estudio.



Figura 15. Proliferación a tiempo real en el sistema xCelligence. A. Imagen de un E-plate de 16 pocillos visto desde la parte superior B. Se muestra la parte inferior del E-plate donde se ven los electrodos para la determinación de la resistencia al paso de corriente C. Sistema xCelligence de tres platos

### 3.5. Ensayos de migración a tiempo real

Para los ensayos de migración se usó el sistema xCelligence pero con los platos de invasión del fabricante, CIM- plates (ACEA Bioscience, San Diego, CA, EEUU) constituidos por una cámara superior y otra inferior separadas por una membrana con poros de 8  $\mu\text{m}$  (Fig. 16). En la cámara inferior se pusieron 160  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo con una cantidad superior a la estándar de suero fetal bovino (20% FBS), que actuará como quimioatrayente para las células; en la cámara superior se pusieron 30  $\mu\text{L}$  de DMEM para hacer una medida basal y luego sembrar 100.000 células por pocillo.



**Figura 16.** Ensayos de invasión a tiempo real en el sistema xCelligence. A. Se muestra una imagen de las cámaras superior e inferior de un CIM-plate. B. Esquema explicativo de un CIM-plate donde se encuentran ensambladas las cámaras superior e inferior. En el dibujo se puede observar cada cámara y la disposición de las células en cultivo.

El equipo xCelligence se programó para realizar medidas cada 15 minutos durante 48 horas y así determinar la impedancia en la membrana de microporos; esta se extrapoló a un índice celular para estimar la cantidad de células que atraviesan los microporos.

## 3.6. Inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunocitoquímica se sembraron las células en un portaobjetos dentro de una placa de cultivo, y se dejaron proliferar hasta alcanzar una confluencia del 70-90%; posteriormente se fijaron con etanol de 96°.

El ensayo de inmunocitoquímica se realizó de forma automática en un inmunoteñidor con *AutostainerLink 48* (Dako- Aligent, Glostrup, Dinamarca ). El protocolo de inmunotinción incluyó las siguientes etapas de incubación:

- a. Bloqueo: reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako- Aligent, Glostrup, Dinamarca) durante 5 minutos.
- b. Primer anticuerpo: Anticuerpo monoclonal de ratón DJ-1 (Santa Cruz, Biotechnology, EEUU) prediluido e incubado durante 30 minutos.
- c. Incubación con polímero de dextrano conjugado con peroxidasa e inmunoglobulinas de cabra anti-ratón y anti-conejo durante 20 minutos.
- d. Solución de trabajo de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno (Dako- Aligent, Glostrup, Dinamarca) durante 10 minutos.
- e. Contratinción con hematoxilina EnVision FLEX (Dako- Aligent, Glostrup, Dinamarca) durante 15 minutos.



## 4. Resultados

### 4.1. Perfil de expresión de DJ-1 en las líneas celulares de MU.

Se analizaron los niveles de expresión de la proteína DJ-1 en cinco líneas celulares de melanoma uveal, y en un cultivo primario de melanocitos normales previamente establecido por nuestro grupo<sup>139</sup>. En concreto, la línea celular UM-A se analizó en pases tempranos (UMA1) y en pases más tardíos (UMA2) con mayor potencial metastásico.<sup>136</sup> En este análisis se observa una mayor expresión de DJ-1 en las líneas celulares de MU frente al nivel detectado en los melanocitos normales; además se observa que el nivel de expresión de DJ-1 en la línea celular UM-A era superior en el cultivo con mayor capacidad invasora (Fig. 17).

En segundo lugar, se estudió la presencia de DJ-1 en el medio condicionado de las mismas líneas celulares; observándose una secreción superior de esta proteína en cualquiera de las líneas celulares de MU comparado con los melanocitos control (Fig. 17).

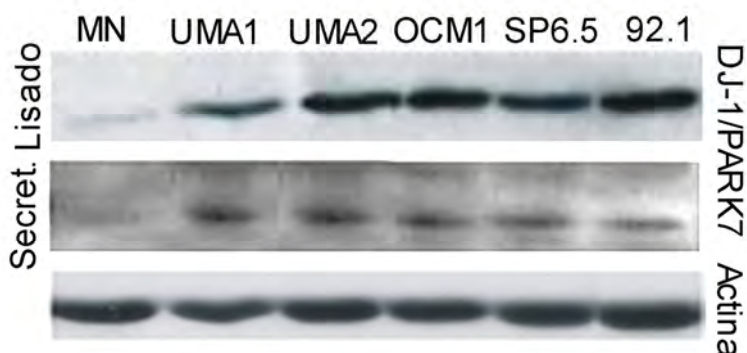


Figura 17. Expresión y secreción de DJ-1 en las líneas celulares de MU. Se muestra una imagen representativa de la inmunodetección de DJ-1 en lisados celulares totales (panel superior) y en secretomas (panel inferior) de melanocitos normales (MN) y líneas celulares de MU (UM-A, OCM1, SP6.5, y 92.1). UMA1: pase temprano y UMA2: pases más tardíos con mayor potencial metastásico. Se muestra la inmunodetección de actina como control de carga.

## 4.2. La inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 disminuye la proliferación de las líneas celulares de MU.

Después de analizar el grado de expresión de la oncoproteína DJ-1 en las líneas celulares de MU a estudio, y tras la optimización de la transfección en las líneas celulares de MU con GFP, como se describe en el apartado 3.1.4 de Material y Métodos (Fig. 14 y Fig. 18A y B), se procedió a silenciar la expresión de la proteína DJ-1 mediante el uso de un siRNA comercial dirigido contra PARK7/DJ-1.

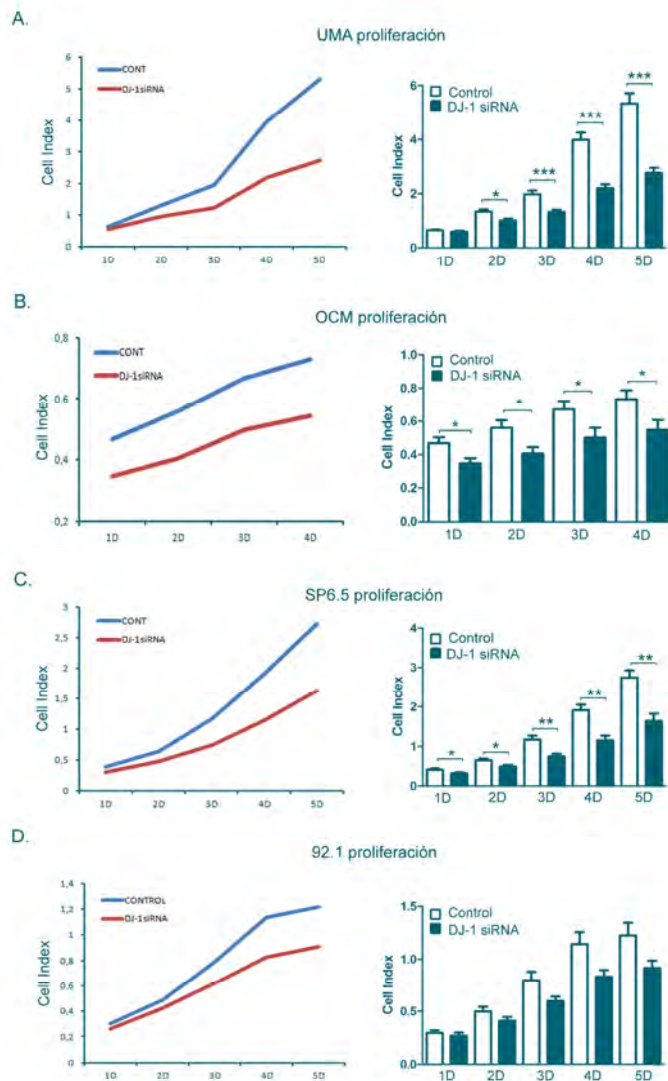
Se hizo un primer estudio mediante inmunocitoquímica para constatar la efectividad del silenciamiento en células sin silenciar, células silenciadas con siRNA control, y las células silenciadas con el siRNA dirigido contra DJ-1 en las células UM-A, 92.1 y SP6.5. Así se pudo observar que la señal de DJ-1 se encontraba disminuida en las células silenciadas con siRNA PARK7/DJ-1 (Fig. 18C) comparadas con los dos grupos control. La efectividad del silenciamiento de PARK7 se analizó a continuación mediante inmunodetección en lisados celulares de los mismos cultivos, confirmando la disminución de la expresión de DJ-1 en los tres grupos celulares de MU frente a sus respectivas células control (64% de disminución en UM-A, 54% en 92.1, y un 50% en SP6.5); esta disminución resultó estadísticamente significativa en UM-A (Fig. 18D).





El efecto de la inhibición de PARK7/DJ-1 sobre la proliferación de las células de MU se valoró con ensayos de proliferación a tiempo real (xCelligence-RTPA) que registra datos de índice celular (*CI: Cell index*), frente a tiempo; con ello se obtuvieron gráficas que extrapolan la proliferación de cada tipo celular con o sin silenciamiento de DJ-1 en el tiempo. El análisis del índice celular a lo largo de un máximo de cinco días tras la transfección, mostró en todas las líneas celulares de MU ensayadas diferencias en la proliferación entre los dos grupos analizados; con una disminución en la proliferación celular en el grupo silenciado con siRNA DJ-1 (Fig. 19 A-D).

El análisis estadístico de las medias de ambos grupos (control y grupo silenciado para DJ-1) encontró diferencias estadísticamente significativas en las líneas celulares UM-A a partir del segundo día tras el silenciamiento, y en OCM y SP6.5 tras las 24 horas (Fig. 19 A-C). El efecto inhibidor sobre la proliferación más aparente se observó al silenciar DJ-1 en el cultivo UM-A, manteniéndose en el tiempo al menos hasta el día 5 (Fig. 19 A). En la línea celular 92.1 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, aunque se puede observar que la tendencia es similar a la encontrada en las otras líneas celulares (Fig. 19 D).



**Figura 19. Efecto del silenciamiento de PARK7/DJ-1 sobre la proliferación de las células de MU. Se muestran gráficos e histogramas del índice celular (*Cell Index*) en el tiempo con o sin inhibición de la expresión de PARK7/DJ1 de las líneas celulares de melanoma uveal A. UM-A, B. OCM, C. SP6.5, y D. 92.1. Se representan las medias del índice celular de al menos 3 experimentos de proliferación / silenciamiento independientes, y el análisis estadístico de cada línea celular frente a su control para cada tiempo determinado [Mann Whitney DJ-1 siRNA vs Control siRNA donde \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; y \*\*\*  $p < 0.001$ ].**

## 4.3. La inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 disminuye la invasión de las líneas celulares de MU.

Para el estudio del efecto de la inhibición de PARK-7/DJ-1 sobre la capacidad de invasión de las líneas celulares de MU se empleó el mismo sistema xCelligence-RTPA; pero esta vez usando platos diseñados para el análisis de la migración (CIM-Plate). Este tipo de ensayo sólo fue posible en las células UM-A y SP6.5. El porcentaje de células que pasa la membrana para migrar hacia la cámara inferior de estos platos de cultivo, que está determinado por el índice celular, es superior en las células control de ambas líneas celulares con la expresión de DJ-1 intacta, al del grupo de células cuya expresión fue inhibida (Fig. 20 A-B). Al comparar las dos líneas celulares, se observa que este efecto inhibitorio es más evidente a las 24-48 horas tras el silenciamiento en UM-A, empezándose a perder a los tres días (Fig. 20 A). Por otro lado, en SP6.5 se observa una mayor inhibición de la invasión a las 48 horas, y sobre todo a las 72. Sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las células control o silenciadas probablemente debido a la gran variabilidad observada entre experimentos.

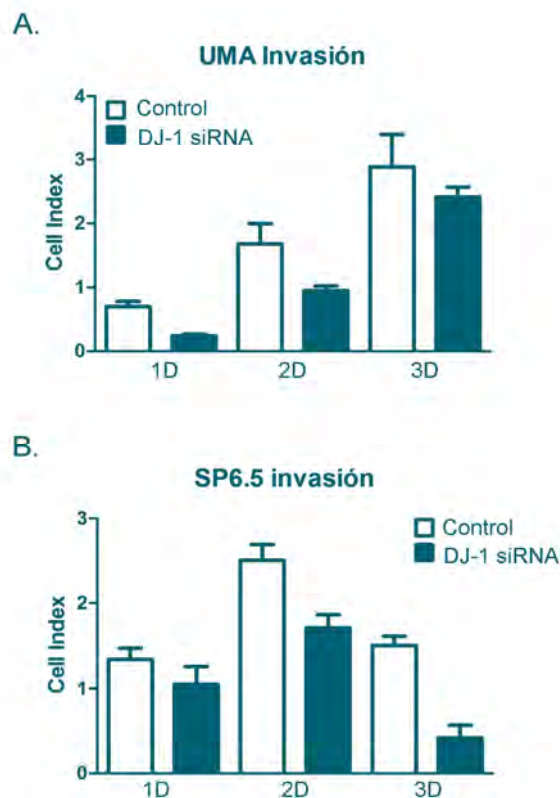
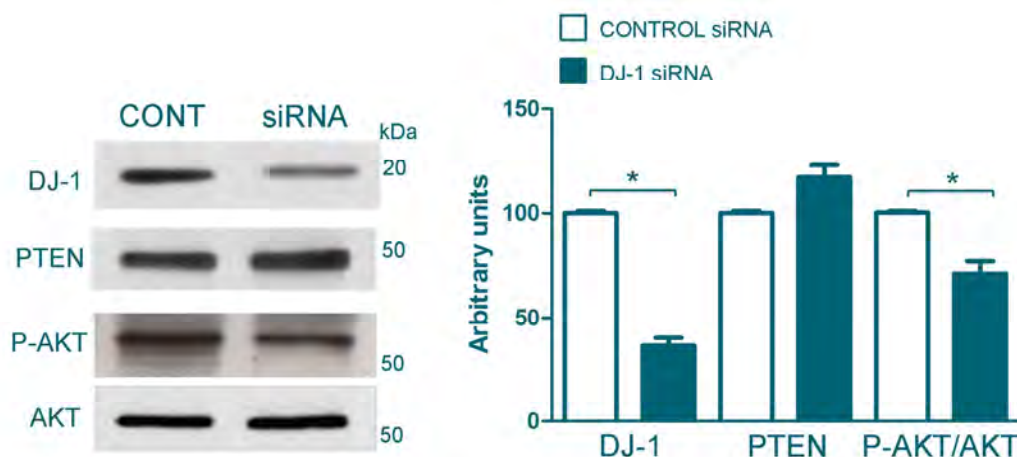


Figura 20. Efecto del silenciamiento de PARK7/DJ-1 sobre la invasión de células de MU. Se muestran histogramas con las medias del índice celular (*Cell Index*)  $\pm$ SEM en el tiempo de al menos tres experimentos independientes de migración/ silenciamiento realizados en A. UM-A y en B. SP6.5.

#### 4.4. La inhibición de la expresión de DJ-1 aumenta los niveles de PTEN y disminuye los de Akt.

Una vez comprobado el efecto de la inhibición de DJ-1 sobre la proliferación e invasión celular en el melanoma uveal, se planteó el estudio de la vía de señalización PI3K/Akt implicada en la supervivencia celular y metástasis tumoral. Tras la inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 con siRNA se realizó un estudio de expresión de Akt y su forma activa fosforilada en la Ser473, y PTEN. Como se muestra en la Figura 21, los niveles disminuidos de DJ-1 en las células de MU silenciadas para PARK7/DJ-1 fueron acompañados con un ligero aumento de PTEN y una disminución significativa de p-Akt corregido por los niveles de expresión de Akt total.



**Figura 21** Efecto de la inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 sobre la vía de PI3K/Akt en las células de MU A. Se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de DJ-1, PTEN, p-Akt y Akt en células de UM-A transfectadas con siRNA control y silenciadas con siRNA contra PARK7/DJ-1; B. Se representan los histogramas con la cuantificación de la expresión donde los valores están expresados como la media  $\pm$ SEM de al menos tres experimentos independientes frente a su control [Mann Whitney DJ-1 siRNA vs Control siRNA donde \*  $P < 0.05$ ].

## 5. Discusión

En trabajos previos de Pardo *et al.* se identificó por primera vez la expresión de DJ-1 en el proteoma, y su presencia en el secretoma de las células de melanoma uveal en cultivo.

<sup>134,135</sup> Posteriormente, estos resultados pre-clínicos pudieron ser validados al descubrir la proteína DJ-1 a nivel circulante en la sangre de pacientes con nevus y melanomas uveales.

<sup>136</sup> Sorprendentemente, un estudio de la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto (URQTIA) con una cohorte de pacientes reveló que las concentraciones séricas de DJ-1 se incrementan significativamente en los nevus durante su etapa previa a la transformación maligna mostrando una correlación positiva con factores clínicos de riesgo de crecimiento; sin embargo, los niveles caen una vez establecido el tumor, indicando que DJ-1 estaría implicado en los estadios iniciales de la formación tumoral. <sup>137</sup>

Bajo este contexto, en este trabajo se intenta dilucidar cuál podría ser el papel funcional de la proteína DJ-1 a nivel intracelular en las células de MU en cultivo. Para ello se planteó encontrar una posible acción de DJ-1 sobre los procesos de proliferación y migración celular en el melanoma uveal, así como analizar la vía de señalización PI3K/Akt implicada en la supervivencia celular y metástasis.

### 5.1. Silenciamiento de la expresión de PARK7/DJ-1 en cultivos celulares de MU

La aproximación metodológica para el análisis funcional de DJ-1 en MU en esta tesis se basó en la inhibición transitoria de la expresión de PARK7/DJ-1 mediante la transfección de siRNAs comerciales. La transfección transitoria tiene la limitación del corto período de tiempo disponible para observar los efectos y el grado de silenciamiento génico, que este caso no superó un 60%; sin embargo existen evidencias en la bibliografía confirmando su eficacia. En concreto, se ha descrito siRNAs para PARK7 capaces de inhibir el crecimiento tumoral en modelos murinos desnudos de carcinoma de laringe escamoso, <sup>140</sup> de inducir

la muerte celular en células de mieloma,<sup>141</sup> la apoptosis en células Hela,<sup>142</sup> o mejorar la sensibilidad de células de cáncer de mama a quimioterápicos.<sup>143</sup> Durante el trascurso de este trabajo se ha intentado la inhibición estable de PARK7/DJ-1 mediante infección viral con shRNAs; desafortunadamente dicha infección no fue viable causando muerte celular. Desconocemos si este efecto se debe a la toxicidad de la infección viral o al efecto pro-apoptótico que se describe en la bibliografía al inhibir PARK7/DJ-1.<sup>118</sup>

## 5.2. Papel de DJ-1 en la proliferación y migración en cultivos celulares de MU

Los resultados observados en el perfil de proliferación en los cultivos de MU tras el silenciamiento de la expresión de PARK7/DJ-1, evidencian una disminución significativa del crecimiento celular en todas las líneas celulares; lo que revela el posible papel de esta proteína en la proliferación de las células tumorales melanocíticas. De hecho, se observa una mayor inhibición de la proliferación en los estudios a tiempo real en las líneas celulares donde se consiguió una mayor eficiencia en el silenciamiento de PARK7. Esto consolida los resultados de los trabajos previos de la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores intraoculares del Adulto (URQTIA) de Santiago de Compostela, que sugieren a DJ-1 como un biomarcador en el MU, y en concreto como un marcador temprano implicado en la transformación de nevus a melanoma. Parece que DJ-1 podría estar implicado en la promoción del crecimiento de las lesiones melanocíticas pre-tumorales, por lo tanto, tener un papel en la carcinogénesis del MU.<sup>137</sup> Este papel de la proteína DJ-1 en la formación y progresión tumoral ya había sido descrita previamente en distintos tipos de cánceres,<sup>125,126,144</sup> pero nunca en el melanoma uveal. Así, en la literatura se describe la sobreexpresión de DJ-1 en múltiples tumores: cáncer de próstata,<sup>145</sup> carcinoma hepático,<sup>133</sup> carcinoma renal de células claras, carcinoma no microcítico de pulmón,<sup>146</sup> carcinoma de ovario,<sup>120</sup> cáncer de cérvix,<sup>142</sup> adenocarcinoma ductal de páncreas,<sup>147</sup> carcinoma laríngeo de células escamosas,<sup>148</sup> carcinoma gástrico<sup>149,150,151</sup> y en leucemia.<sup>122</sup>

En cuanto al papel inductor de la proliferación, existen numerosos trabajos que implican la sobreexpresión de DJ-1 en la proliferación de líneas celulares de leucemia;<sup>122</sup> de cáncer de hígado,<sup>152,153</sup> de carcinoma escamoso de laringe,<sup>140,154</sup> cáncer de mama,<sup>155</sup> y meduloblastoma.<sup>156</sup>

En general, parece que los niveles incrementados de DJ-1 en las células tumorales, le confieren un papel importante para la resistencia a las especies reactivas de oxígeno, debido a sus capacidades antioxidantes; promocionando el crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Lo contrario a lo que sucede en las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, donde la pérdida de función del DJ-1 produce una mayor susceptibilidad celular al estrés oxidativo y conduce a la muerte neuronal.<sup>157</sup>

Los resultados obtenidos en el presente trabajo referidos a la proliferación celular, sugieren a DJ-1 como una molécula con una posible acción en el crecimiento celular de las lesiones melanocíticas uveales. Este resultado concordaría en parte, con lo observado en el estudio inmunohistoquímico de los globos oculares enucleados por MU (Resultados del Capítulo 3), donde un alto porcentaje de los tejidos tumorales estudiados presentaban una alta intensidad de tinción y un gran porcentaje de células teñidas para DJ-1. Hay que tener en cuenta que en general, y en concreto en la serie de pacientes estudiados, la indicación para enucleación incluye MU de tamaño grande o MU con mala respuesta a tratamiento conservador, es decir, existe un crecimiento rápido o marcado de la lesión tumoral; esto se podría explicar con un aumento del estrés oxidativo en este proceso de crecimiento que fomentaría la expresión de DJ-1, que, a su vez, podría promocionar la supervivencia de las células tumorales. Es una limitación que no sea posible hacer estos estudios inmunohistoquímicos en lesiones pre-malignas de MU, pues sería útil poder comparar los niveles de expresión de DJ-1 en tejido, con los valores circulantes de la proteína; según los trabajos previos de nuestro grupo en la URQTIA, los niveles mayores de secreción de proteína ocurrirían en las fases previas a la transformación de nevus a melanoma. En este sentido, es importante destacar un trabajo



previo sobre la expresión y secreción de DJ-1 en cáncer de mama donde se describen niveles elevados a nivel circulante que se correlacionan con estadios más avanzados. El análisis de expresión en tejido sin embargo, encuentra niveles de expresión de mensajero elevados que no se corresponden con los niveles de proteína; probablemente por la alta tasa de secreción de DJ-1 en estos tumores. Es interesante, además, que estos mismos autores describen una isoforma concreta de DJ-1, con un punto isoeléctrico de 6,3, como la más elevada en cáncer de mama a nivel circulante.<sup>158</sup> Sería en este momento interesante averiguar si existe esta isoforma descrita en mama en el MU, y si la forma soluble de DJ-1 tiene alguna función; y si es así, si difiere del de la misma proteína a nivel intracelular. Es posible que la fracción secretada sea sólo un reflejo de la sobreexpresión de DJ-1 a nivel intracelular/tisular.

Es importante destacar que el mecanismo de acción de DJ-1 en tumores no es bien conocido. Así, hay autores que han estudiado su acción en el cáncer esofágico y han encontrado que la función de DJ-1 varía en función de la localización de la proteína dentro de la célula; es decir, que un incremento de los niveles citoplasmáticos de DJ-1 en células tumorales en comparación con el epitelio esofágico normal, se encontraban asociados a la transformación neoplásica, mientras que unos niveles incrementados de DJ-1 a nivel nuclear se correlacionaban con un alto potencial metastásico.<sup>123</sup> En las imágenes obtenidas por inmunocitoquímica en las líneas celulares de MU, se ha encontrado expresión de esta proteína principalmente a nivel citoplasmático, aunque también existe cierta positividad nuclear; lo que concuerda con los resultados observados en el cáncer de esófago y el papel del DJ-1 citoplasmático en la proliferación celular.<sup>159,123</sup> En cuanto al estudio de la tinción inmunohistoquímica, en nuestro trabajo sólo se cuantificó la intensidad de DJ-1 global, sin diferenciar el tipo de tinción intracelular; por lo tanto esto sería una limitación para poder analizar los resultados de esta serie que requeriría un estudio más pormenorizado teniendo en cuenta la localización celular de la señal.



Por otro lado, en lo referente a los resultados obtenidos en los experimentos de migración, parece existir una tendencia en las células silenciadas a disminuir la migración comparado con las células con la expresión de DJ-1 intacta aunque no se haya encontrado una diferencia estadísticamente significativa. De hecho, existen numerosas referencias que describen el papel de DJ-1 en la migración e invasión tumoral de otros cánceres.<sup>160,150,161,162,132,163</sup> Como se ha señalado previamente, podría ocurrir que la expresión de otro tipo de actividad de DJ-1, que en IHQ se manifestara como nuclear estuviera actuando en la promoción de la migración de las células tumorales, y esta actividad nuclear no sea tan relevante en estas líneas celulares. Además, existen artefactos en la metodología experimental elegida que podrían interferir en la migración de las células; así al tratarse de una transfección transitoria no existe una inhibición de la expresión de la proteína desde el tiempo cero de migración ni se consigue una inhibición total del gen, por lo que las células podrían migrar a través de los microporos antes de que fuese efectiva la inhibición de la expresión del DJ-1. Además así como no se apreció variabilidad en los ensayos de proliferación a tiempo real, sí se ha observado mucha variación en los datos obtenidos entre platos de invasión, impidiendo sacar conclusiones en alguna de las líneas celulares a estudio. Serían necesarias nuevas aproximaciones experimentales para poder identificar el papel de PARK7/DJ-1 en la migración celular del MU, empleando tal vez una línea celular en la que la inhibición de DJ-1 sea estable; lo que, a su vez, permitiría conseguir un éxito de silenciamiento superior a la transfección transitoria. Todo ello siempre que esta inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 no cause realmente una apoptosis masiva tal y como indican trabajos previos.<sup>141,142</sup> Si fuera así, la inhibición de la expresión de PARK7 se podría postular como una nueva diana terapéutica para el tratamiento del MU tal y como se ha sugerido previamente para el tratamiento de otros cánceres.<sup>115,143</sup>

### 5.3. Vía PTEN-Akt

Además de la proliferación e invasión, en esta tesis se ha estudiado el efecto de la inhibición de PARK7/DJ-1 sobre la ruta del fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), que regula la supervivencia celular, antagonizada por el supresor tumoral PTEN. En la literatura se ha identificado el DJ-1 como un inhibidor del PTEN; y se sabe que la sobreexpresión del DJ-1 conduce a la fosforilación de Akt y con ello el aumento de la supervivencia celular.<sup>164</sup>

En los resultados de inmunodetección en células de MU silenciadas frente a las células control se observa como en las células que se ha silenciado el DJ-1 aumenta la expresión de PTEN y, por tanto, disminuye la de p-Akt. Esto sugiere, que DJ-1 podría tener una acción en la inhibición del gen supresor tumoral PTEN, y con ello una activación de Akt, en las líneas celulares de MU.

Estos resultados se asemejan a lo que se han encontrado en otros trabajos con tumores. En líneas celulares de leucemia, la inhibición con siRNA de DJ-1 produce un aumento en el mRNA de PTEN; lo que conlleva un aumento en la vía PI3K-PTEN, que genera un aumento en la supervivencia celular.<sup>122</sup> En muestras de cáncer de mama, la expresión de DJ-1 también se ha correlacionado negativamente con la inmunorreactividad de PTEN y positivamente con la hiperfosforilación de PKB / Akt.<sup>165</sup> En cultivos celulares de cáncer gástrico se ha descrito el aumento de fosforilación de Akt, que produce un aumento de la migración e invasión celular con un aumento de las metalopeptidasas de matriz MMP-2 y MMP-9.<sup>151</sup> Y en muestras de carcinoma de pulmón no microcítico primario, la expresión de DJ-1 aumentó en comparación con el tejido pulmonar no neoplásico, y se correlacionó positivamente con la incidencia de recaída. DJ-1 es, por tanto, un regulador negativo clave de PTEN que puede ser un marcador pronóstico útil para el cáncer.<sup>165</sup>

Aunque en múltiples tumores se ha descrito la principal acción del DJ-1 como inhibidor del gen supresor tumoral PTEN, también se ha encontrado otras vías en las que el DJ-1 puede actuar como modulador; así en líneas celulares de carcinoma pancreático, donde la

principal acción de la oncoproteína DJ-1 es en la migración celular; no está activada la vía PTEN/Akt, sino la vía ERK/SRC fosforilada.<sup>132</sup>

Sin embargo, en este trabajo, al analizar los resultados de inmunohistoquímica de DJ-1 y PTEN en cortes tumorales (Capítulo 3), no se ha encontrado una correlación inversa entre los niveles de ambos, identificándose señales muy positivas de ambos marcadores en los mismos tumores. Estos resultados abren el campo de estudio a otras vías de actuación del DJ-1, como parece ocurrir en las líneas celulares de cáncer de páncreas. Así se han descrito varias vías de señalización celular reguladas por DJ-1, como regulando negativamente la actividad de ubiquitinación de HIF-1α inhibiendo la interacción HIF-VHL.

<sup>166</sup> Además, existen estudios que sugieren una función antiapoptótica de DJ-1 a través de la represión de la actividad transcripcional de p53,<sup>167</sup> y también por su acción antioxidante, aumentando la síntesis de glutathione y activando el regulador transcripcional antioxidante Nrf2, que induce la acción de genes antioxidantes.<sup>113,126</sup>

Por otro lado, en la literatura, se describen tres trabajos contradictorios sobre la presencia de mutaciones de PTEN en el MU. En un trabajo con líneas celulares de tumor primario y de metástasis de MU, empleando FISH y estudio de mRNA de PTEN, demuestran que las alteraciones en el gen de PTEN en líneas celulares del MU están ausentes;<sup>168</sup> sin embargo, otro trabajo ha encontrado disminución de la expresión de PTEN en tejido tumoral y ha detectado alteraciones genéticas en este gen supresor.<sup>169</sup> Otro trabajo más reciente ha detectado un microRNA-454 que funciona como un oncogén regulando la acción de PTEN.<sup>170</sup> Todo ello sugiere la necesidad de un análisis más profundo sobre el papel de PTEN.

En conclusión, en nuestro trabajo se confirma el papel de la oncoproteína DJ-1/PARK7 en la proliferación celular de cultivos de MU, y además, se sugiere una acción promotora sobre migración celular; sin embargo, serían necesarios nuevos estudios para confirmar este segundo papel de DJ-1 en el MU. En cuanto a la vía o vías moleculares en las que está implicada, parece que podría tener un papel sobre la vía PTEN/Akt, pero probablemente actúe a nivel de otras rutas celulares.





## Capítulo 2: Senescencia en melanoma uveal

---





## Capítulo 2: Senescencia en MU

### 1. Introducción

La senescencia celular es un estado permanente de detención del ciclo celular que fue descrito por la observación del crecimiento celular en cultivos *in vitro*. Más tarde, esta respuesta celular fue identificada, tanto *in vitro* como *in vivo*, como diferentes formas de respuesta de la célula al estrés; como los pases continuados *in vitro*, el daño al DNA causado por la quimioterapia, o la expresión de oncogenes activados entre otros; <sup>171</sup> y más recientemente se ha visto también implicado en procesos fisiológicos durante el desarrollo. <sup>172</sup>

Las células senescentes se paran en la fase G0/G1 del ciclo celular y se distinguen por un fenotipo típico, con alteraciones como una morfología agrandada y aplanada, núcleos agrandados o multinucleados, y un aumento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (SA- $\beta$ -gal) asociada a la senescencia. <sup>173</sup> Además, las células senescentes secretan una gran variedad de factores al ambiente extracelular conocidos como fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP: *senescence-associated secretory phenotype*). Este fenotipo secretor reforzaría la detención del ciclo senescente de manera autocrina y también paracrina. <sup>174</sup> Los componentes del SASP son principalmente citoquinas y quimioquinas inflamatorias, factores de crecimiento y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular que pueden alterar el microambiente tisular e interactuar con el sistema inmune induciendo el reconocimiento y eliminación de las células senescentes y así facilitar la reparación del daño.

El proceso de senescencia celular fue descrito por primera vez en cultivos celulares de fibroblastos humanos por Hayflick y Moorhead en 1965. <sup>175</sup> Estos autores observaron

cómo los fibroblastos humanos normales en cultivos celulares proliferaban hasta que al llegar a un punto de acumulación de pases en el que las células dejaban de responder a factores de crecimiento, mantenían su actividad metabólica, cambiaban su morfología y dejaban de proliferar; un comportamiento que contrastaba con el que ocurría en los cultivos de células tumorales que no dejaban de proliferar. Los eventos moleculares responsables del proceso de senescencia se han estudiado profundamente desde entonces, y en este momento se creen implicados una combinación de al menos tres mecanismos:

- a) Acortamiento de telómeros
- b) Aumento de expresión del locus CDKN2A que codifica para INK4A y ARF
- c) Acumulación de daño en el ADN

La contribución relativa de cada uno de estos mecanismos, va a depender del tipo celular y las condiciones de cultivo. <sup>171</sup>

El descubrimiento de un fenotipo similar al senescente en células normales en crecimiento *in vitro* donde se sobreexpresó una forma oncogénica de HRAS, y la participación en este proceso de los supresores de tumores INK4A y p53 en células estresadas oncogénicamente, introdujo el concepto de senescencia inducida por oncogén (OIS: *oncogene-induced senescence*) como un mecanismo supresor de tumores similar al fenómeno de apoptosis inducida por oncogén. <sup>176</sup> Así la presencia de células senescentes en tumores murinos y humanos fue descrito en una serie de estudios por la presencia de marcadores de senescencia en tumores pre-malignos y su ausencia en los malignos. <sup>177</sup>

No existe un marcador definitivo de senescencia; para definir una célula como senescente se necesitan varias evidencias. El marcador más usado para la senescencia celular es la determinación enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal <sup>178</sup> o la actividad de SA- $\beta$ -gal (*senescence-associated- $\beta$ -galactosidase*).



La actividad  $\beta$ -Galactosidasa se deriva del incremento del contenido lisosomal en las células senescentes, que permite la detección de la actividad lisosomal de  $\beta$ -Galactosidasa a pH subóptimo 6,0.<sup>179</sup> La actividad  $\beta$ -Galactosidasa es considerada un marcador de senescencia celular *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, se ha detectado reacción positiva para SA- $\beta$ -gal en situaciones de estrés celular no relacionados con senescencia como en situaciones de alta confluencia celular o serodeprivación en cultivos celulares.<sup>180</sup>

El hecho principal del proceso de senescencia es la detención del ciclo celular a pesar de que las células continúan siendo metabólicamente activas. Esta detención del crecimiento es impuesta por reguladores del ciclo celular como inhibidores kinasa dependientes de ciclinas de la familia INK, como p16 y CIP/KIP, como p21.<sup>181</sup> Aunque, también la quiescencia y la detención transitoria del crecimiento pueden aumentar los niveles de inhibidores del ciclo celular, por lo que es necesario que además de la identificación de niveles elevados de estas proteínas, se presenten niveles bajos de proliferación, determinados generalmente con el marcador Ki67 o la reacción con BrdU (5-*bromo-2-desoxiuridina*).<sup>182</sup>

### 1.1. Senescencia y cáncer

La senescencia celular podría considerarse como un mecanismo de supresión tumoral. Sería considerada como un mecanismo de restricción del cáncer a través de un bloqueo celular autónomo de la proliferación de células oncogénicas. En un principio, la senescencia se vio mediada por dos rutas supresoras de tumores principales en la célula, las rutas ARF/p53 y la de INK4a/RB. El concepto de senescencia inducida por oncogén como un mecanismo inhibidor de la proliferación fue demostrada al inducir la expresión ectópica de Ras oncogénico en un cultivo primario de células normales donde se observó que el proceso senescente estaba mediado por p53 y p16INK4a.<sup>183</sup> La pérdida de estos supresores de tumores es imprescindible para conseguir la transformación oncogénica de

las células humanas *in vitro*; de hecho, estas rutas están frecuentemente alteradas en cánceres humanos.<sup>184,185</sup>

Se ha visto que los supresores tumorales pueden agruparse en dos categorías en función de su efecto en la senescencia. Los supresores tumorales que previenen la excesiva señal de oncogénesis y su delección en células normales produce senescencia denominados “*upstream*”, y los supresores tumorales de oncogenes que perciben la excesiva señal de oncogénesis induciendo la senescencia, y su ausencia en las células tumorales permite la progresión tumoral (también llamados “*downstream*”).<sup>177</sup>

El oncogén empleado para la descripción inicial de la senescencia inducida por oncogén *in vitro* en ratones fue HRAS<sup>G12V3</sup> y la vía Raf/Mek controlada por Ras se ha descrito como una de las más relevantes que conduce a senescencia.<sup>186</sup> Existen evidencias en la bibliografía de que Kras<sup>G12V</sup> provoca senescencia en estadios iniciales del cáncer de pulmón o pancreático<sup>187</sup> y que Braf<sup>V600E</sup> produce senescencia en tumores pulmonares y nevus cutáneos.<sup>188,189</sup> NRAS y HRAS también inducen senescencia, en tejido linfóide y glándula mamaria respectivamente.<sup>190</sup>

También se ha visto que efectores distales de la vía de Ras como los factores de transcripción de la familia de E2f inducen senescencia.<sup>191</sup> Por otro lado, la vía PI3K/Akt juega un papel importante en la génesis de señales de senescencia. La pérdida de PTEN, una fosfatasa que inhibe a la actividad de PI3K, induce en la próstata del ratón una neoplasia intraepitelial con características celulares típicas de senescencia; lo mismo produce la expresión de AKT1 que muestra marcadores de senescencia.<sup>192</sup> (Fig. 22)

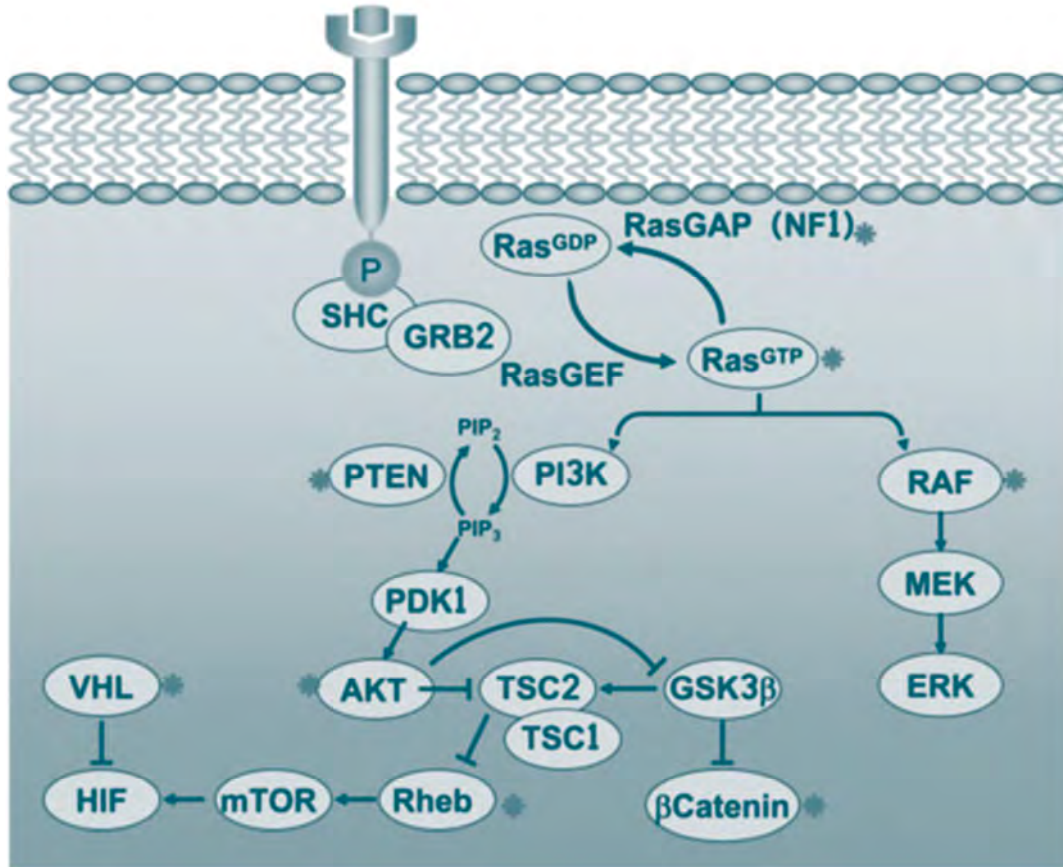


Figura 22: Vías de señalización y oncogenes que producen senescencia modificada de Collado *et al.* <sup>177</sup>

Además de en modelos animales, se ha evidenciado la presencia de senescencia tumoral en varias lesiones tumorales y pre-tumorales en humanos como neurofibromas de piel, nevus, hipertrofia de próstata y adenomas de colon.<sup>177</sup>

Por todo lo anterior, se ha sugerido la quimioterapia inductora de senescencia para el tratamiento del cáncer como una aproximación terapéutica útil de manera individual, o combinada con otras terapias.<sup>177</sup>

## 1.2. Senescencia en el MU

Los estudios previos en MU relacionados con la senescencia celular analizaron el papel de la radiación ionizante sobre cultivos celulares. El primer estudio realizado por He *et al.* describe como el efecto de la radiación ionizante sobre la línea celular de MU, 92.1, produce una parada en la fase G2 a las 15 horas de ser expuestas a 10 Gy de rayos X, y cómo gradualmente se presentaban características de senescencia en 5 días, sin presentar apoptosis.<sup>193</sup> Posteriormente, estos autores utilizaron técnicas de SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) para detectar las proteínas implicadas en la detención del ciclo celular, que pudieran servir como marcadores para conocer el mecanismo de detención celular.<sup>194</sup>

En otro trabajo, Zhang *et al.*, encontraron que los iones de carbono y los rayos X producían un aumento de la SA- $\beta$ -gal en células de la línea celular de MU 92.1 al quinto día postradiación, y la abolición de Ki67 al tercer día postradiación, además de abolir la proliferación celular a las 24 horas tras la radiación. A los 5 días, estas células presentaban una forma aplanada y alargada coincidente con las características morfológicas de las células senescentes.<sup>195</sup> En cuanto a los niveles de proteína p16INK4a eran casi indetectables independientemente de haber recibido o no tratamiento de rayos X. Los resultados de este trabajo sugieren que la senescencia celular en 92.1 se establece a través de la vía p53/p21; estableciendo al p21 como el principal regulador de senescencia celular en la respuesta a la radiación ionizante.<sup>195</sup>

En el trabajo de Zhang distinguen dos tipos de radiación ionizante, que causan dos tipos de daños en el DNA; los rayos X y los iones pesados. La radiación producida por iones pesados presenta alta transferencia de energía lineal (LET: *linear energy transfer*), mientras que la producida por rayos X tiene una baja LET. Los daños en el DNA que producen los rayos X son más fáciles de reparar, y en caso de ser permanente se asocia a daño en los telómeros, lo que generaría la senescencia, mientras que el daño producido por los iones pesados produce un daño importante del DNA y lleva a la senescencia.<sup>195</sup>

El otro estudio realizado en muestras de tejido tumoral por Coupland *et al.* estudia, mediante IHQ en cortes de tejido parafinado de globos oculares enucleados por MU y retinoblastoma, el patrón de la Ciclina D1 y proteínas reguladoras de la fase G1-S del ciclo celular, encontrando p53, p21 y p16 presentes en ambos tipo tumorales.<sup>196</sup>



## 2. Objetivo

En los últimos años muchos grupos han estudiado el papel de la senescencia como mecanismo supresor de la proliferación celular en el cáncer, tanto en modelos animales como en humanos, pero en el MU los estudios en senescencia son escasos, y la mayoría limitados a estudios con líneas celulares de este tumor.

El objetivo de este trabajo ha sido intentar identificar un perfil de senescencia en cultivos celulares de MU, así como estudiar en muestras anatomo-patológicas de MU enucleados la inmunorreactividad para marcadores de senescencia establecidos, como p16 y p21, así como el PTEN, que es otro supresor tumoral reconocido; y también marcadores de proliferación como Ki67. El grado de presencia de estos marcadores se relacionó con la supervivencia de los pacientes enucleados por MU para describir si existe un patrón inmunohistoquímico que pueda servir como predictor pronóstico.



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Criterios de inclusión y exclusión

##### 3.1.1. Criterios de Inclusión

- Diagnóstico de MU en la Unidad de Retina Quirúrgica y Tumores Intraoculares del Adulto (URQTIA) del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (Santiago de Compostela)
- Cirugía con intención curativa entre Enero 1999 y Junio 2015.
- Datos de seguimiento completos.
- Material histológico almacenado en el Biobanco del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

##### 3.1.2. Criterios de exclusión

- Neoplasia en los 5 años previos al diagnóstico de MU.
- Incapacidad para entender los procedimientos del estudio y firmar el consentimiento informado.
- Exitus en el postoperatorio inmediato (<60 días después de la cirugía).
- Datos incompletos.
- Material histológico insuficiente, dañado o imposibilidad de clasificación inmunohistoquímica por la presencia de abundante melanina.

La recogida de datos clínicos fue llevada a cabo de forma centralizada mediante la revisión de las historias clínicas de todos los pacientes incluidos. Los datos clínico-patológicos obtenidos de cada paciente fueron: edad, sexo, tratamiento recibido, fecha de diagnóstico, fecha de enucleación, fecha de diagnóstico de enfermedad sistémica y supervivencia.

Las muestras anatómo-patológicas empleadas se obtuvieron a partir de las piezas quirúrgicas procedentes de enucleaciones. De cada una de las muestras se evaluaron todas las preparaciones histológicas disponibles, seleccionando aquellas áreas que contuviesen una cantidad óptima de tumor y excluyendo las zonas con necrosis o inflamación. Una vez elegidas las preparaciones más representativas de cada caso, se seleccionaron sus respectivos bloques.

### 3.2. Técnica inmunohistoquímica (Ki67, p16, p21, PTEN y DJ-1)

La técnica inmunohistoquímica se realizó de forma automática en un inmunoteñidor AutostainerLink 48 (Dako, Glostrup, Dinamarca). El protocolo de inmunotinción incluyó las siguientes etapas de incubación:

- a) Reactivo de bloqueo de peroxidasa (Dako- Aligent, Glostrup, Dinamarca) durante 5 minutos.
- b) Anticuerpos monoclonales de ratón anti-Ki67 (clon MIB1, Dako, Glostrup, Dinamarca), prediluido e incubado durante 30 minutos, anticuerpos monoclonales de ratón anti-p16 (CINTEC Histology, Roche, Basilea, Suíza), p21 (Clon SX118, Dako, Glostrup, Dinamarca), PTEN (Clon, 6H2.1, Dako, Glostrup, Dinamarca) DJ-1 (Santa Cruz, Biotechnology) prediluidos e incubados durante 30 minutos.
- c) Incubación con Envision FLEX+ Mouse Linker (Dako, Glostrup, Dinamarca) para amplificar la señal (15 minutos, sólo para Ki67).



- d) Polímero de dextrano conjugado con peroxidasa e inmunoglobulinas de cabra anti-ratón y anti-conejo durante 20 minutos.
- e) Solución de trabajo de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina con peróxido de hidrógeno (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 10 minutos.
- f) Contratinción con hematoxilina EnVision FLEX (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 15 minutos.

Entre las distintas etapas se realizaron lavados con tampón (Dako, Glostrup, Dinamarca) y tras la última, las secciones se lavaron de nuevo en tampón durante 5 minutos, para posteriormente proceder a su deshidratación, aclaramiento y montaje.

### 3.3. Clasificación e interpretación inmunohistoquímica

Todas las secciones fueron evaluadas por dos observadores de forma independiente. Se seleccionaron las áreas con mayor expresión de la proteína para su valoración. En los casos discordantes se realizó un acuerdo interobservadores para el análisis estadístico final. Se evaluó la intensidad y la celularidad mediante un sistema de doble Score previamente descrito (ver trabajos de Yuen *et al.* y Angi, M<sup>121,89</sup>).

Las variables de intensidad de tinción para los marcadores Ki67, p21, p16, PTEN y DJ-1 son variables discretas con cinco niveles (0, 1, 2, 3 y 4). El valor 0 indica que no existe tinción; el valor 1 se corresponde con el valor más bajo de tinción y el 3, con el más alto; en algunos casos se han marcado datos no valorables que han sido codificados como 4. Dichas variables se denotan por Ki67.INTENSIDAD, P21.INTENSIDAD, P16.INTENSIDAD, PTEN.INTENSIDAD y DJ1.INTENSIDAD, respectivamente. (Tabla 5)

Las variables de porcentaje de células para los marcadores Ki67, p21, p16, pTEN y DJ-1 son, de nuevo, variables discretas con cinco niveles (0, 1, 2, 3, 4). Los valores 0, 1, 2, y 3 se corresponden con los porcentajes de células teñidas 0%, 1-33%, 34-66% y 67-100% respectivamente. El nivel 4 corresponde con los datos no valorables. Dichas variables se

denotan por Ki67.CÉLULAS, P21.CÉLULAS, P16.CÉLULAS, PTEN.CÉLULAS y DJ1.CÉLULAS, respectivamente. (Tabla 5)

Las variables score para los marcadores Ki67, p21, p16, PTEN y DJ-1, salvo para p21; toman el valor 1 si la suma de la variable intensidad y porcentaje de células teñidas es mayor o igual que 4 y 0 en otro caso. Para p21, a cualquier valor distinto de 0 se le asocia el valor 1. Censurando el nivel 4 de las variables intensidad y porcentaje de células teñidas para el cálculo del score. (Tabla 5)

INTENSIDAD DE LA TINCIÓN	0: AUSENCIA DE TINCIÓN 1: TINCIÓN DÉBIL 2: TINCIÓN MODERADA 3: TINCIÓN INTENSA
CELULARIDAD (PORCENTAJE GLOBAL DE CÉLULAS TEÑIDAS)	0: NO CÉLULAS TEÑIDAS 1: 1-33% DE LAS CÉLULAS 2: 33-66% DE LAS CÉLULAS 3: > 66% DE LAS CÉLULAS
SCORE: Ki 67, P16, PTEN y DJ1: si la suma de los parámetros intensidad y celularidad es igual o mayor a 4 se define como alta expresión, mientras que si es menor a 4: baja expresión. P21: Si Score >0: expresión. Si score =0: no expresión	

Tabla 5: Clasificación IHQ y cálculo del score

### 3.4. Cultivo primario de células de MU humano

Los cultivos primarios de MU humano se realizaron a partir de fragmentos tumorales de globos oculares enucleados con consentimiento informado entregado a todos los individuos del estudio, y que ha sido aprobado por el CEIC de Galicia (Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia). Además de contar con la aprobación y colaboración del

Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

El fragmento se recogió el mismo día de la enucleación en DMEM, y una vez en el laboratorio se procedió a su digestión bajo una campana de flujo laminar usando siempre material estéril. Se troceó con un bisturí y se recogió con DMEM para pasarlo a un tubo de 25mL. Se llenó el tubo con DMEM y se centrifugó 5 minutos a 30 ° C a 1.000 rpm sin freno. Se decantó y se añadió 1mL de *solución enzimática\** para resuspender el pellet enérgicamente con una pipeta manual. Se añadieron 9 mL más de solución enzimática, y se dejó 15 minutos en incubador a 37° C. Se decantó parte de la solución enzimática para pipetear de nuevo el pellet, y se repitió la incubación de 15 minutos en cuando la disgregación no había sido completa.

Se lavaron las células, y para ello se rellenó el tubo de 25 mL con medio completo (DMEM 10% FBS y penicilina estreptomycin), y se centrifugó durante 5 minutos a 30° a 1000 rpm. Se repitió el lavado para asegurarse que no quedaran restos de enzimas. Se resuspendieron las células en medio completo con antibióticos para ser sembradas en placas Petri de 35 mm. No se cambió el medio hasta que transcurrieron unas 24-48 horas.

Solución Enzimática:

- Hialuronidasa 0.1%
- Colagenasa 0.4%
- Dispasa 0.2%
- Deoxirribonucleasa 0.01%
- Se disolvieron las enzimas en 9 mL de DMEM, se filtraron a través de un filtro de 0.2μ y se añadió 1mL de FBS

### 3.5. Tinción $\beta$ -galactosidasa

La tinción con Sa $\beta$ G se realizó en cultivos celulares primarios, en fragmentos de tejido tumoral en láminas de 10  $\mu$ m de espesor de tejido fresco o criopreservado en OCT (*Optimal Cutting Temperature Compound*); todas las muestras fueron obtenidas de enucleaciones de globos oculares con MU. Las muestras se fijaron primero a temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos, dependiendo del tipo de muestra, con una solución de formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% en PBS. Después de lavar tres veces con PBS, las muestras se tiñeron incubando durante la noche a 37 ° C con una solución de tinción que contenía:

Solución de tinción:

- 0,1% de X-Gal
- 5 mM de ferrocianuro de potasio
- 150 mM de cloruro sódico
- 2 mM de cloruro de magnesio en 40 mM Solución de ácido cítrico / fosfato sódico, pH 6,0.

La reacción se terminó lavando las muestras con agua destilada.

Las células teñidas se observaron directamente bajo un microscopio de campo claro invertido, mientras que las muestras de tejido completo se fijaron durante la noche en formalina a 4°C, se deshidrataron con dos etapas consecutivas en etanol al 50% y 70% y se embebieron en parafina para seccionar en serie. Las secciones de parafina y las crio secciones fueron contrastadas con rojo nuclear rápido (*nuclear fast red* (NFR)).

### 3.6. Análisis estadístico

Los datos recogidos de las variables clínicas y anatomopatológicas se incluyeron en una base de datos Access (MS Access, Microsoft Office 2007, Microcomputer Software, Redmond, Washington, EEUU).

El tratamiento y análisis estadístico ha sido realizado por la empresa Biostactech con el software libre R (R Core Team, 2016)<sup>197</sup>, y el software estadístico SPSS versión 19.0.

Se realiza el análisis de las distintas relaciones consideradas, en función de los objetivos planteados en este trabajo, para la determinación de las funciones de supervivencia y la correlación entre variables. Para comprobar si las diferencias halladas eran estadísticamente significativas, es decir, que estas diferencias no se deben al azar, se ha considerado un nivel de significación de  $\alpha = 0,05$ . Por tanto, un p-valor resultante inferior a ese valor, implica la existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos o subgrupos de estudio.

Los contrastes de hipótesis se han realizado a través de distintas técnicas:

Para Variables cuantitativas:

- La ausencia de normalidad de los datos, tras comprobación mediante test de Shapiro-Wilk<sup>198</sup>, hace conveniente la utilización de pruebas no paramétricas. En este caso, se ha empleado el test de Wilcoxon-Mann-Whitney.<sup>199</sup>
- El test U de Mann-Whitney, es una prueba no paramétrica que se basa en los rangos y el número de individuos de las dos muestras a comparar; se trata de una alternativa a la prueba t de Student, cuando no se puede suponer normalidad en la distribución de los datos de dichas muestras.
- Se aplica, por tanto, para comparar la distribución de dos variables independientes cuantitativas cuando no se asume ningún modelo de distribución de probabilidad para las variables. Dadas dos muestras X e Y de tamaños  $n$  y  $m$  respectivamente,

se trata de contrastar la hipótesis nula de que *la probabilidad de que una observación aleatoria de la población X, supere a una observación aleatoria de la población Y es 0.5*, frente a la alternativa en la que se espera que dicha probabilidad sea distinta.

Para Variables categóricas, estudiadas con tablas de contingencia:

- V de Cramer (estudio de asociación):<sup>200</sup> Mide el grado de asociación en tablas de contingencia. Se trata de una reformulación del estadístico chi-cuadrado de Pearson, que minimiza el efecto del tamaño muestral sobre la cuantificación del grado de asociación. Cuando alguna de las variables tiene sólo 2 categorías (como ocurre en el caso de este estudio), este coeficiente coincide con el coeficiente  $\phi$  (phi) de Pearson. El estadístico resultante es el coeficiente V de Cramer, cuyos valores oscilan entre 0 y 1, de forma que cuánto más próximos a 1 son sus valores, mayor es la asociación entre sus variables. Se suele considerar una asociación leve cuando  $V \leq 0.3$ , asociación moderada para  $0.3 < V \leq 0.5$  y fuerte asociación cuando  $V > 0.5$ .
- Contraste de independencia Chi-cuadrado con la corrección de Yates: La corrección de Yates se aplica al test chi-cuadrado cuando al menos el valor de una frecuencia esperada es menor que 5. En general, se aplica la corrección de Yates o también corrección por continuidad, cuando aproximamos una variable discreta a una distribución continua.
- Test exacto de Fisher: se emplea cuando las condiciones de tamaño muestral y de frecuencias esperadas del test chi-cuadrado no se cumplen: tamaño muestral  $> 30$  y frecuencias esperadas  $> 5$ , o que las frecuencias esperadas  $< 5$  sean menos del 20%. El contraste se basa en la probabilidad condicionada de las frecuencias absolutas, que sigue una distribución hipergeométrica. Se calcula el p-valor sumando las probabilidades del valor de la frecuencia absoluta observado, y de los valores más extremos que el observado.<sup>201</sup>

- Test de razón de verosimilitudes: La razón de verosimilitudes Chi-cuadrado, es una alternativa al estadístico Chi-cuadrado, cuando el objetivo es contrastar la hipótesis nula de independencia entre las variables. La diferencia estriba en que, en este caso, se calcula el cociente entre las frecuencias observadas y esperadas.
- Riesgo relativo (RR): es el cociente entre el riesgo en el grupo con el factor de exposición y el riesgo en el grupo de referencia (que no tiene el factor de exposición). Es decir, es el cociente de las probabilidades condicionales. Es una medida relativa del efecto, que indica cuánto más veces tiende a desarrollar el evento en el grupo de sujetos expuestos al factor de exposición, o de riesgo, en relación con el grupo no expuesto. El riesgo relativo puede tomar valores entre 0 e infinito. Cuando  $RR=1$ , no hay asociación entre la presencia del factor y el riesgo de evento. Si  $RR>1$ , se establece una asociación positiva, es decir, la presencia del factor se asocia con una frecuencia de evento mayor. En cambio, cuando  $RR<1$ , la asociación es negativa, por lo que la presencia del factor se asocia con una menor frecuencia de evento (se dice que ese factor es un factor protector).

La supervivencia global (SG) se calculó desde la fecha de la enucleación hasta la fecha de la muerte o el último seguimiento. La supervivencia libre de enfermedad (SLE), desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de detección de enfermedad sistémica, la muerte por cualquier causa, o la fecha del último seguimiento. El análisis de la supervivencia global y de la supervivencia libre de enfermedad se realizó aplicando en primer lugar un modelo de Kaplan-Meier, estimando la mediana y el intervalo de confianza (IC) del 95%. Las diferencias en las curvas de supervivencia fueron comparadas mediante el test de Log-Rank. Para todos los análisis realizados se estableció un riesgo bilateral, o nivel de significación  $\alpha=0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Características de la población

Se incluyeron en el estudio 58 pacientes consecutivos, diagnosticados de MU en la URQTIA de Santiago de Compostela (entre marzo de 1999 y septiembre de 2015) que fueron tratados mediante enucleación del globo ocular. De los 58 pacientes, 11 fueron excluidos del estudio por los siguientes motivos:

- dos pacientes por material histológico insuficiente
- dos casos por muestra histológica dañada
- seis casos por imposibilidad de interpretación de la inmunohistoquímica por la presencia de melanina muy abundante (Fig. 23)
- un caso por datos clínicos incompletos

Finalmente se realizó el análisis de la inmunorreactividad de los cinco marcadores (Ki67, p21, p16, PTEN y DJ-1) y la significación estadística con los 47 pacientes restantes.

La distribución de la población estudiada en función del sexo fue de 24 hombres (50,1 %) y 23 mujeres (49,9%). La mediana de edad al diagnóstico son 62 años, con un rango de edad entre 21 y 87 años. En cuanto a la localización tumoral, 43 pacientes presentaban tumores coroides (89,4%) y los 4 restantes tumores localizados en el cuerpo ciliar (8,5%); y en relación al tratamiento previo: 33 pacientes (70,2%) no habían recibido tratamientos previos y 9 pacientes (19,1%) habían sido tratados con braquiterapia, 1 paciente (2,1 %) con termoterapia transpupilar (TTT) y Endorresección de un paciente (2,1%). (Tabla 6)



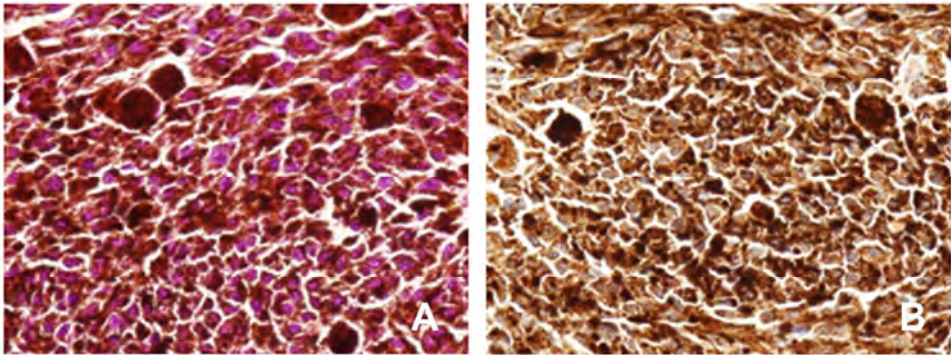


Figura 23. A. H-E representativa de un corte histológico de un tumor de MU donde se observa una pieza con células tumorales cargadas de gran cantidad de melanina (aumento de objetivo 40x). B. Inmunodetección de DJ-1 en el mismo tumor donde no es posible interpretar los resultados de la inmunorreacción debido al artefacto que provoca la melanina (aumento de objetivo 40x).

Características	
Edad	
Mediana	62 años
Rango	21-87 años
Sexo	
Hombre	24 (50,1%)
Mujer	23 (49,9%)
Localización	
Coroides	43 (89,4%)
Cuerpo ciliar	4 (8,5%)
Tratamiento Previo	
No	33 (70,2%)
Braquiterapia	9 (19,1%)
TTT	1 (2,1%)
Endorresección	1 (2,1%)

Tabla 6. Características de la población seleccionados para el estudio.

## 4.2. Análisis de la presencia de senescencia en el MU

Se estudiaron los marcadores conocidos de senescencia p21, p16, y PTEN; Ki67 como marcador de proliferación y también se añadió el análisis de DJ-1 como oncoproteína de interés en la URQTIA y objeto de estudio en el Capítulo 2 de este trabajo. Para ello se realizó un estudio inmunohistoquímico retrospectivo donde se clasificaron las muestras en función de dos variables discretas: a) intensidad de tinción y b) porcentaje de células teñidas para cada uno de los marcadores. En las Figuras 24 y 25 se muestran fotos representativas para cada uno de los marcadores en tumores compuestos por células de tipo fusocelular, y otro caso de predominio epitelioide.

### Ki67

La inmunorreactividad de Ki67 fue determinada con las dos variables: KI67.INTENSIDAD y KI67.CÉLULAS en 46 casos.

En un alto número de pacientes no se detectó positividad para Ki67, 24 casos (52%), en el resto de los casos la tinción era casi siempre débil, con un porcentaje de células con un grado de tinción variable (ver anexo I).

### P21

En 29 casos (61%) no existía tinción por inmunohistoquímica para p21; y en caso de existir inmunotinción era débil con un porcentaje de células teñidas variable (ver tabla de contingencia anexo I).

### P16

La inmunorreactividad de p16 en los 46 casos estudiados seguía una distribución muy variable, en 8 casos no se detectó inmunorreactividad, pero en 7 presentaban una

inmunotinción intensa y en un alto porcentaje de células, siendo positivos según el score 26 casos (56%). La mayor parte de los casos presentaban una inmunotinción intermedia (ver anexo I).

### PTEN

La inmunorreactividad de PTEN pudo medirse en 46 casos. En 10 casos (22%) no existía tinción; en la mayoría de los casos existía un alto porcentaje de células con tinción para PTEN, 28 (60%) casos presentaban tinción en >66% de las células. Aunque la mayoría presentaban una intensidad débil o como mucho moderada de tinción (ver anexo I).

### DJ-1

En el caso de esta oncoproteína la tendencia en la mayoría de los casos era a presentar una intensidad de tinción alta y casi la totalidad de las células tumorales eran inmunorreactivas. De los 47 casos estudiados, 34 presentaban una tinción intensa y en más del 66% de las células tumorales, lo que supone un 72% de los pacientes con una inmunorreactividad muy alta para este marcador (ver anexo I).

Al estudiar la correlación o dependencia con una Chi-cuadrado de Pearson entre las dos variables que determinan la inmunorreactividad de los tejidos para cada marcador (INTENSIDAD y CÉLULAS), se encontró una correlación significativa con una  $p < 0,005$  en cada uno de los cinco marcadores, es decir, que los casos con baja intensidad también solían presentar bajo porcentaje de células teñidas, y lo mismo para los de alta intensidad y alto porcentaje de células.

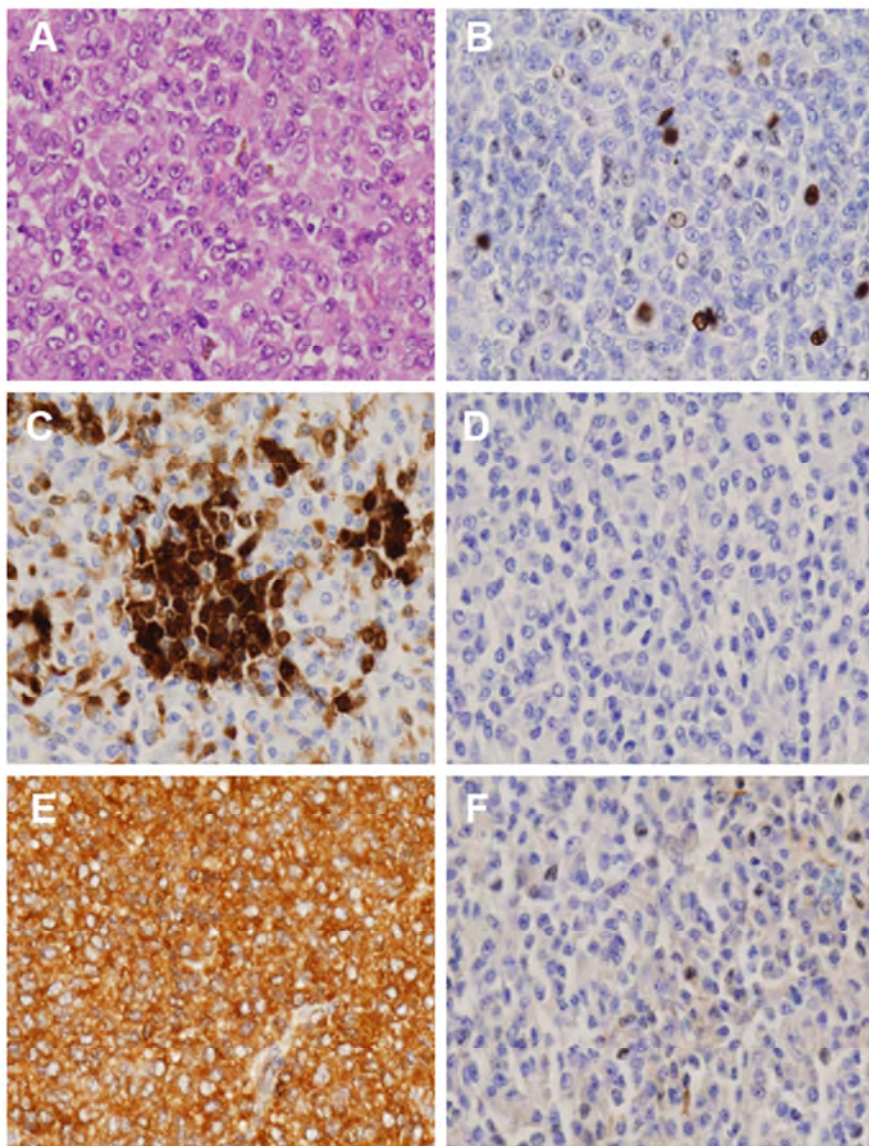
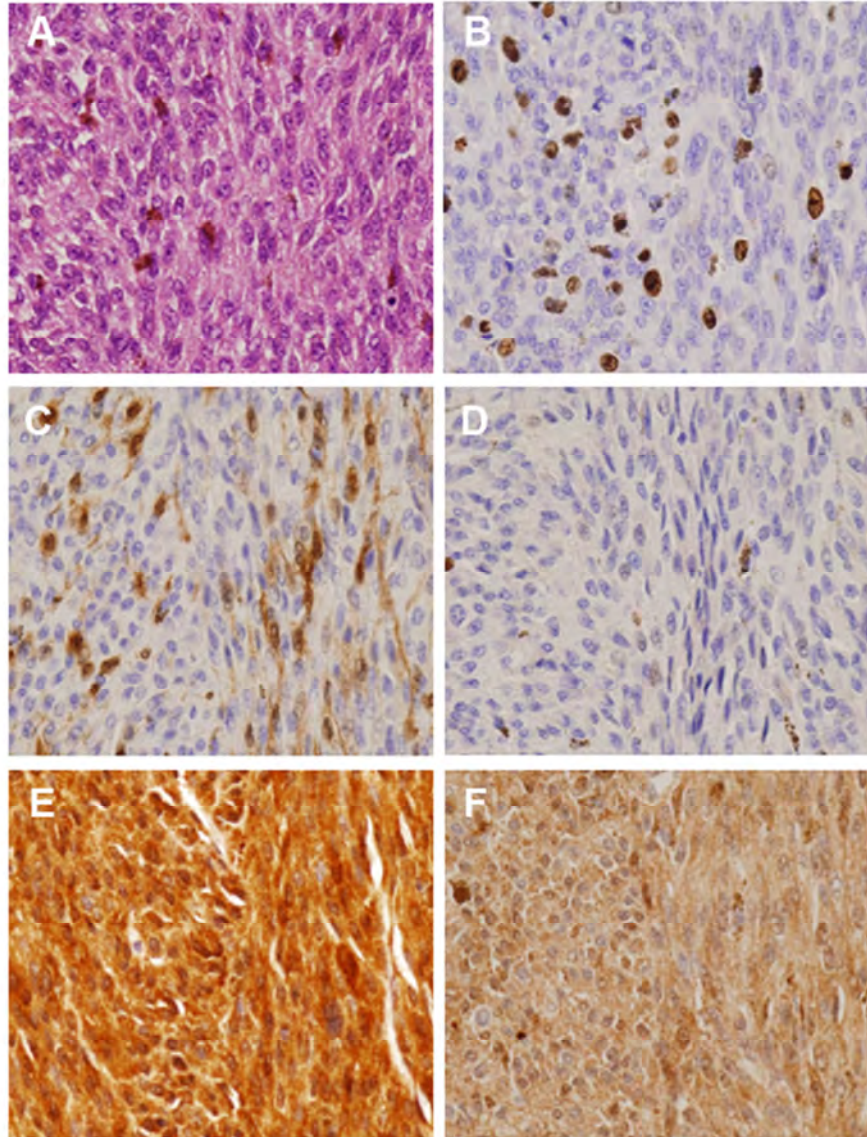


Figura 24. Análisis de marcadores de senescencia en secciones de tumores de MU con predominio de células epitelioides. A. Se muestra una tinción de hematoxilina/eosina de un melanoma tipo epiteliode con núcleos redondeados, nucléolo evidente, y células ocasionales cargadas con melanina (aumento de objetivo 40x). B. Immunodetección de Ki67: se observa una tinción moderada en un número reducido de células (40x). C. P16: Tinción nuclear y citoplasmática muy intensa en, aproximadamente, la mitad de las células tumorales (40x). D. P21: este marcador presenta tinción negativa en la totalidad de células tumorales (40x). E. DJ-1: Tinción citoplasmática intensa en la mayoría de las células (40x). F. PTEN: Se observan muy escasos núcleos positivos (se señala algún núcleo) (40x).



Figura 25. Análisis de marcadores de senescencia en secciones de tumores de MU con predominio de células fusiformes. A.HE: se observan núcleos fusiformes cortados longitudinalmente a la derecha de la imagen y transversales a la izquierda; ocasionales células presentan pigmento melánico (señaladas con flecha) (aumento de objetivo 40x). B. Ki67: se observa tinción nuclear en un número moderado de células (40x). C. P16: Tinción nuclear y citoplasmática en un número moderado de células (40x). D. P21: Tinción negativa, se observan ocasionales células cargadas de melanina (40x). E. DJ-1: Tinción intensa prácticamente en la totalidad de las células tumorales (40x). F. PTEN: Tinción moderada en la mayoría de las células tumorales (40x).



4.3. El tratamiento previo no afecta a la intensidad de tinción de los marcadores de senescencia

Se compararon las variables de intensidad de tinción para cada uno de los marcadores estudiados en los supuestos de tratamiento previo o sin tratamiento previo. Para ello se calcularon las medianas de las variables KI67.INTENSIDAD, P21.INTENSIDAD, P16.INTENSIDAD, PTEN.INTENSIDAD y DJ1.INTENSIDAD; en los dos grupos, con tratamiento previo y el sin tratamiento previo. (Tabla 7)

MEDIANA	SIN TRATAMIENTO PREVIO	CON TRATAMIENTO PREVIO
Ki67	1	0
P21	0	0
P16	2	2
PTEN	1	1
DJ1	3	3

Tabla 7. Mediana de las variables KI67.INTENSIDAD, P21.INTENSIDAD, P16.INTENSIDAD, PTEN.INTENSIDAD y DJ1.INTENSIDAD con y sin tratamiento previo.

Para el análisis estadístico se empleó el test de Wilcoxon-Mann-Whitney para muestras independientes. No se detectaron diferencias significativas para ninguno de los marcadores con un nivel de significación 0,05. (Tabla 8)

	P-valor	Estadístico
Ki67	0,103	237,0
P21	0,840	174,5
P16	0,876	175,5
PTEN	0,508	205,0
DJ-1	0,616	167,0

Tabla 8. P-valores y estadístico de contraste para el test de Wilcoxon-Mann-Whitney de las medianas de intensidad de biomarcadores

Se puede concluir así, que la administración o no de tratamiento previo no genera diferencias significativas en las variables que registran la intensidad de los marcadores.

## 4.4. Relación entre los distintos biomarcadores

Se estudió la correlación entre los scores de los biomarcadores agrupados de dos en dos, empleando tablas de contingencia (ver anexo I): el estadístico usado fue V de Cramèr. Mediante este análisis solo se encontró una relación estadísticamente significativa, entre PTEN y p21, presentando una relación de intensidad moderada según el estadístico V de Cramer ( $V=0,337$ ),  $p=0,03$ .

Al haber encontrado relación entre los marcadores PTEN y p21, se calculó el riesgo relativo con la siguiente fórmula

$$RR = \frac{P(PTEN.SCORE=1|P21.SCORE=1)}{P(PTEN.SCORE=1|P21.SCORE=0)}$$

En este caso el RR es 1,67; por tanto, los pacientes con inmunorreactividad para p21 tienen más probabilidad de tener positividad para PTEN (la probabilidad se multiplica por 1,67).

Cabe destacar, en relación a lo explicado en el capítulo 2, que no se ha encontrado una correlación significativa entre la inmunorreactividad de DJ-1 y de PTEN; además el valor del estadístico V de Cramèr era de  $V=0,163$ , lo que indica una relación leve entre ambas variables.

#### 4.5. Análisis de supervivencia e impacto de la presencia de marcadores de senescencia

Con una mediana de seguimiento de 136 meses, se obtuvo la mediana de Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE), que fue de 78 meses, y la mediana de Supervivencia global (SG), de 88 meses (Fig. 26 y Fig. 27 respectivamente).

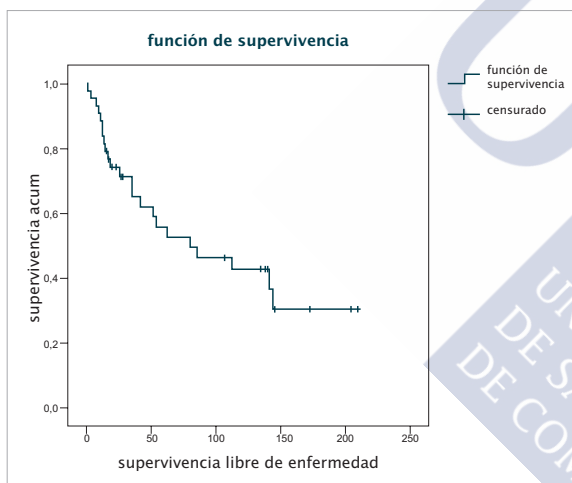


Figura 26. Supervivencia Libre de enfermedad

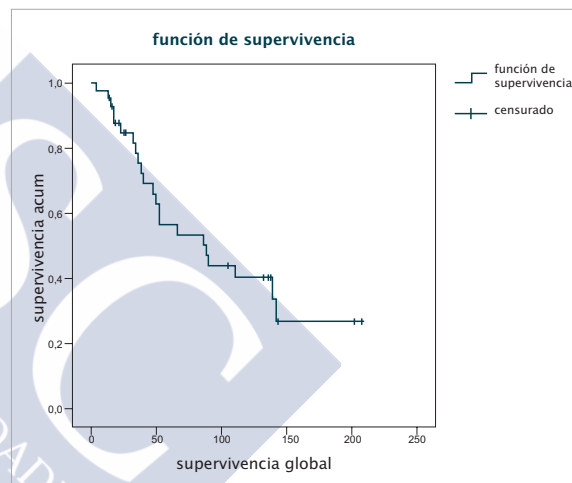


Figura 27. Supervivencia global

A continuación se analizó la supervivencia en función de los valores del *score* de cada uno de los marcadores (Fig. 28).

##### Ki67

Se analizó la supervivencia global de los pacientes con expresión negativa de Ki67 (score 0), comparado con los pacientes con expresión positiva de Ki67 (score 1), observando una tendencia no significativa a presentar una peor supervivencia los casos con positividad para Ki67 (score 1). La mediana de SG de los pacientes sin sobreexpresión de



Ki 67 era de 110 meses frente a los que presentaban sobreexpresión de Ki 67, que era de 47 meses (HR 0.406 IC 95% 0,127 - 1,296; p 0,117). (Fig 28A)

### P21

La comparación la SG de los pacientes con expresión negativa de p21 (score 0), frente a los pacientes con expresión positiva de p21 (score 1), muestran que no existen diferencias en función del score de p21; presentando una mediana de SG en los pacientes sin sobreexpresión de p21 de 52 meses frente a 110 meses en los pacientes con sobreexpresión de p21 (HR 0,981 IC 95% 0,410 - 2,350; p 0,966). (Fig 28B)

### P16

Al comparar la SG en función del score obtenido para p16 no se han observado diferencias en relación a la inmunorreactividad de este marcador; presentando una mediana de SG en pacientes sin sobreexpresión de p16 de 49 meses frente a una mediana de 89 meses para los que presentaban sobreexpresión de p16 (HR 1,179 IC 95% 0,486-2,858, p=0,716). (Fig. 28C)

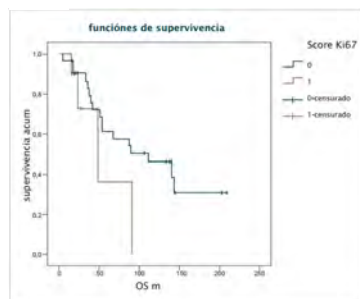
### PTEN

Al comparar la SG en función del score de PTEN se observa una tendencia significativa a una mayor supervivencia en los pacientes sin sobreexpresión de PTEN, frente a los pacientes con sobreexpresión de PTEN; no se alcanzaba la mediana de SG en pacientes sin sobreexpresión de PTEN mientras que en los pacientes con sobreexpresión de PTEN la mediana de SG era de 66 meses, (HR 0,288 IC 95% 0,104 -0,802, p 0,012). (Fig. 28D)

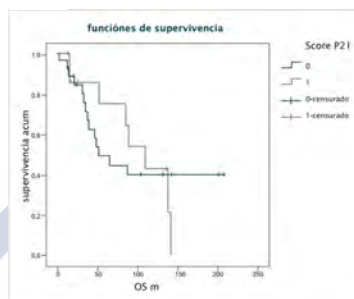
### DJ-1

No se encontraron diferencias en la SG en función del scores de DJ-1; y la mediana de SG en pacientes sin sobreexpresión de DJ-1 mediana de supervivencia no se alcanzaba, mientras que con sobreexpresión de DJ-1 presentaban una mediana de 81 meses, (HR 0,297, IC 95% 0,390 - 2,269; p=0,216). Además cabe destacar que en el grupo de score 0 el número de casos es muy reducido. (Fig. 28E)

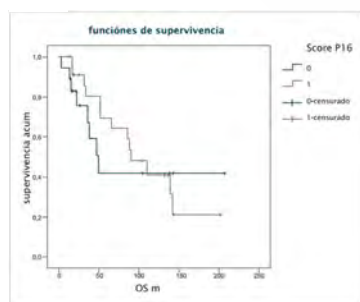
A



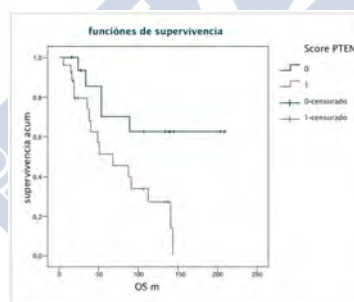
B



C



D



E

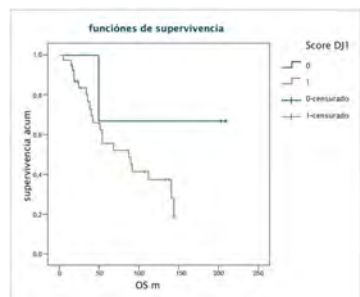


Fig. 28: Funciones de Supervivencia Global (SG) para cada uno de los biomarcadores estudiados según el score. A. Ki67; B. p21; C. p16; D. PTEN; E. DJ-1.

## 4.6. Regresiones múltiples

Se hicieron modelos de regresión logística para valorar si existía relación entre los cinco marcadores, la variable asociada a tratamiento previo, y la edad de presentación del MU, con la muerte por melanoma y la presencia de metástasis.

### 4.6.1. Muerte por melanoma

No se encontró ninguna asociación entre los cinco marcadores, la variable edad de presentación y el tratamiento previo en cuanto a la supervivencia (Tabla 9).

Variable	Coefficiente ( $\beta$ )	Error estándar	Odds ratio	Estadístico Z	P-valor	R <sup>2</sup>
Intercepto	-17.126	1.683.411	-	-0.010	0.992	
KI67.SCORE=1	-0.977	0.988	0.377	-0.988	0.323	
P21.SCORE=1	0.427	0.842	1.533	0.507	0.612	
P16.SCORE=1	0.024	0.797	1.024	0.030	0.976	
PTEN.SCORE=1	0.697	0.833	2.008	0.837	0.403	0.149
DJ1.SCORE=1	14.928	1.683.411	345.330	0.009	0.993	
Edad	0.013	0.029	1.325	0.452	0.651	
Tratamiento previo	0.242	0.844	1.274	0.287	0.774	

**Tabla 9: Coeficiente estimado ( $\beta$ ), error estándar, odds ratio, estadístico Z, p-valor y R<sup>2</sup> del modelo de regresión logística para la muerte por melanoma.**

### 4.6.2. Metástasis

No se encontró ninguna asociación entre los cinco marcadores, la variable edad de presentación y el tratamiento previo en cuanto a la aparición de metástasis (Tabla 10).

Variable	Coeficiente ( $\beta$ )	Error estándar	Odds ratio	Estadístico Z	P-valor	R <sup>2</sup>
Intercepto	-18.449	1.669.276	-	-0.011	0.991	
KI67.SCORE=1	0.241	0.881	1.273	0.274	0.784	
P21.SCORE=1	-0.513	0.836	0.599	-0.613	0.540	
P16.SCORE=1	0.738	0.779	2.091	0.948	0.343	
PTEN.SCORE=1	1.112	0.823	3.042	1.351	0.177	0.190
DJ1.SCORE=1	14.546	1.669.276	199.200	0.009	0.993	
Edad	0.037	0.030	2.187	1.224	0.221	
Tratamiento previo	0.473	0.801	1.605	0.590	0.555	

**Tabla 10: coeficiente estimado ( $\beta$ ), error estándar, odds ratio, estadístico Z, p-valor y R<sup>2</sup> del modelo de regresión logística para la presencia de metástasis.**

#### 4.7. Los cultivos primarios de MU y tejido fresco tumoral son positivos para $\beta$ -galactosidasa

Se realizó un estudio preliminar descriptivo de tinción con el marcador SA- $\beta$ -gal en una línea celular de MU, en cuatro cultivos primarios de MU y en tejido fresco tumoral de 16 pacientes enucleados por MU en la URQTIA desde diciembre de 2014 a febrero de 2016.

En los estudios en cultivos celulares se empleó como control negativo, la línea celular A549 de adenocarcinoma pulmonar, y como control positivo, la línea celular A549 tratada con bleomicina, se observó que en la línea celular UM-A establecida previamente por la URQTIA, la tinción con SA- $\beta$ -gal era negativa; mientras que en cultivos primarios en pases tempranos establecidos a partir de fragmentos tumorales, la tinción con SA- $\beta$ -gal era positiva (Fig. 29).

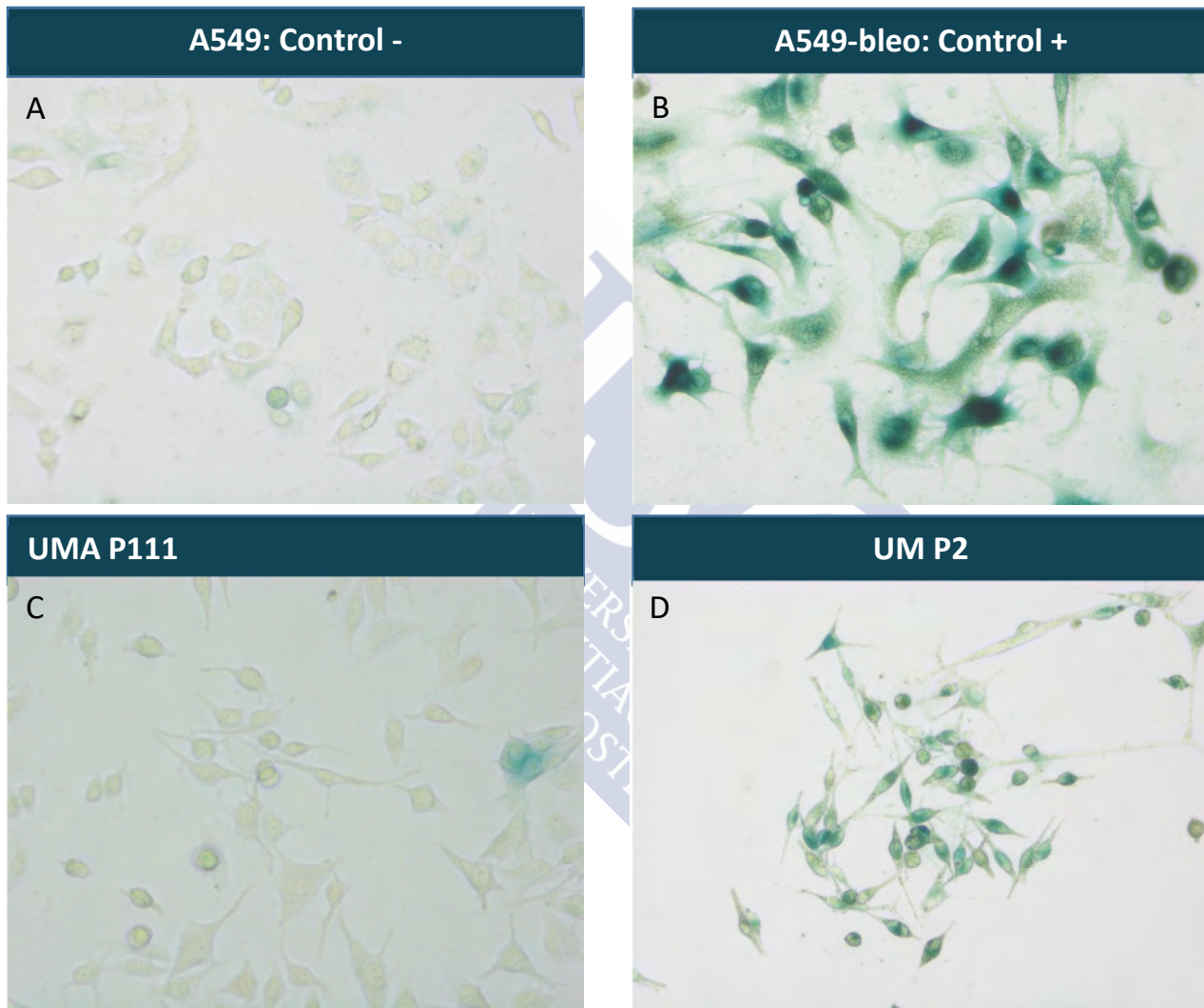


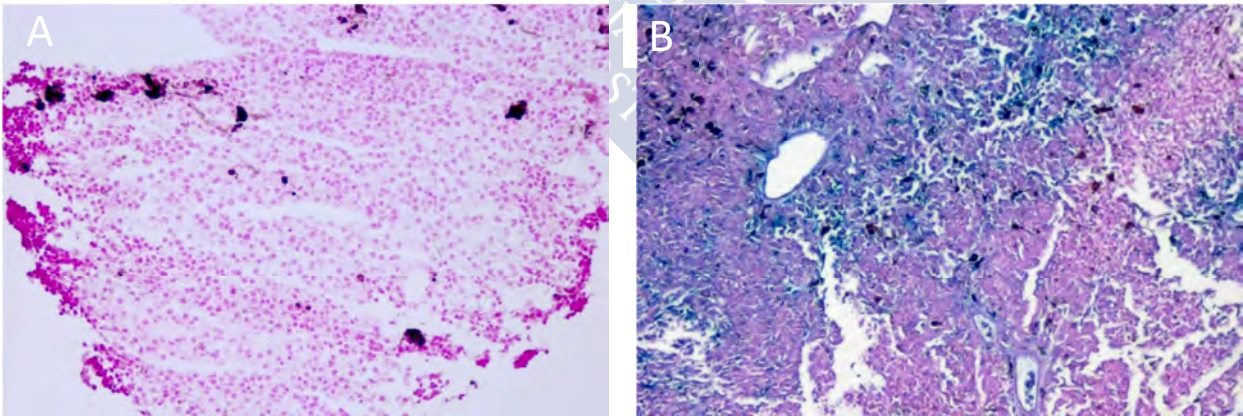
Figura 29. Tinción B-galactosidasa en células de MU. A. Imagen representativa del control negativo para SA-β-gal; B. Control positivo para SA-β-gal C. Tinción SA-β-gal en la línea celular UM-A en pase 111; D. Tinción SA-β-gal en un cultivo primario de MU establecido a partir de un fragmento tumoral fresco.

En cuanto a los estudios con tejido fresco parafinado de los MU enucleados, se refleja en la siguiente tabla los resultados de las tinciones de SA- $\beta$ -gal expresados en dos variables: Intensidad de tinción, y porcentaje de células teñidas usando la misma metodología que en los apartados anteriores de inmunohistoquímica (Tabla 11).

		PORCENTAJE DE CÉLULAS TEÑIDAS PARA SA- $\beta$ -gal				
INTENSIDAD DE TINCIÓN PARA SA- $\beta$ -gal		0	1	2	3	TOTAL
	0	2	0	0	0	2
	1	0	1	2	2	5
	2	0	0	3	0	3
	3	0	1	2	3	6
TOTAL		2	2	7	5	16

**Tabla 11.** Tabla de contingencia Intensidad frente a porcentaje de células teñidas en tejido con SA- $\beta$ -gal.

En general el grado de tinción celular con SA- $\beta$ -gal en tejido tumoral fresco fue intermedio, sólo dos casos no presentaron tinción, y tres mostraron una alta intensidad de tinción con un porcentaje elevado de células teñidas (Fig. 30).



**Figura 30:** Tinción SA- $\beta$ -gal en tejido tumoral de MU. A. Imagen representativa de un tumor de MU cuya tinción SA- $\beta$ -gal fue negativa; B. Imagen de un tumor cuya tinción SA- $\beta$ -gal fue clasificada como intensa.



## 5. Discusión

La mayoría de las células de mamífero normales tienen una vida útil finita, lo que constituye un mecanismo protector contra la proliferación ilimitada de las células. Este fenómeno llamado *senescencia celular*, es impulsado por el desgaste de los telómeros, lo que desencadena la inducción y/o la activación de varios supresores de tumores, incluyendo p16<sup>INK4a</sup>, p53 y p21.<sup>202</sup> La senescencia celular también ha sido descrita como una vía de autocontrol de la célula tumoral en la proliferación celular.

El objetivo de este capítulo ha sido detectar en el MU la presencia de marcadores de senescencia que pudieran servir como marcadores pronóstico en este cáncer.

### 5.1. Expresión de los marcadores de senescencia en el estudio inmunohistoquímico

Los marcadores que se han empleado para el estudio inmunohistoquímico de senescencia en este trabajo ya habían sido recogidos en estudios previos para analizar el control del ciclo celular en el MU; así, en trabajos previos de nuestro grupo Pardo *et al.* encontró en cultivos celulares primarios de MU, mediante estudio con western blot, que los niveles de p16, se encontraban sobreexpresados en las células en cultivo.<sup>139</sup> Mouriaux *et al.* mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral analizaron la presencia de proteínas inhibidoras de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKIs), como p16, p21 y p27, detectando niveles elevados de p16 en el 34% de los casos, p21 en el 37% y p27 en el 28% de los pacientes; además de confirmar mediante western blot en el extracto proteico del tejido tumoral la sobreexpresión de p21 y p27.<sup>203</sup> Posteriormente en un estudio de Coupland *et al.* se analizaron varios marcadores de regulación del ciclo celular en tejido tumoral, entre los que se encontraban p21 y p16. Se encontró inmunorreactividad para p21 en un 65% de los tumores estudiados, aunque el porcentaje de células tumorales positivas para este biomarcador era reducido, con una media de un 8% de las células

tumorales; en el caso de p16 se encontró inmunorreactividad para un 45% de los tumores, con un porcentaje medio de tinción del 12 % de las células tumorales.<sup>196</sup> Los resultados de estos dos trabajos muestran una inmunorreactividad similar a la que se ha encontrado en esta tesis para el marcador p21, donde solo se ha observado positividad para este marcador en un 38% de los casos, muy similar al trabajo de Mouriaux *et al.*, y en la mayoría de ellos el porcentaje de células positivas era bajo (<33%) al igual que el trabajo de Coupland *et al.*

La inmunorreactividad de p16 en tejido tumoral detectada en esta tesis fue superior a lo encontrado en los estudios de Mouriaux y Coupland; se encontró que un 56% de los tumores eran clasificados como positivos según el score que se ha empleado, además de presentar la mayoría un porcentaje de células superior al 33%. Sin embargo estos resultados se asemejan más a otros estudios posteriores a los de Mouriaux y Coupland, donde se detectaron positividad para p16 mediante inmunohistoquímica en tejido tumoral en un 70% de los casos en menos del 50% de las células y en un 7% en mas del 80% de las células tumorales teñidas; estos autores también encontraron que el grado de expresión de p16 se correlacionó con el tipo histológico tumoral, pero no con el grado de invasión local.<sup>204</sup>

En cuanto al marcador usado para determinación de proliferación celular, Ki67, se ha empleado porque es una proteína nuclear que se encuentra activa durante las fases activas del ciclo celular, pero no en las células en reposo. Existen trabajos en MU que han relacionado la determinación inmunohistoquímica de Ki67 con la supervivencia de los pacientes; determinando que un índice de proliferación superior a cero presenta 1,6 veces mayor mortalidad en comparación a la ausencia de inmunorreactividad para Ki67.<sup>64</sup> Existe gran variabilidad en la literatura en cuanto a los valores de la mediana de índice de proliferación celular en MU determinada por Ki67, desde 0,2% hasta el 1,7%; y el porcentaje de tumores con inmunorreactividad para Ki67 en las series varía desde el 56 al 100%.<sup>64</sup>



## 5.2. La intensidad de tinción de los marcadores de senescencia no muestra diferencias entre el grupo de pacientes con tratamiento previo vs sin tratamiento

Respecto a los marcadores de senescencia en el MU, hasta el momento, los estudios previos en este tumor se han realizado en cultivos celulares tratados con radiación <sup>194,205</sup>. En ellos se analiza el efecto de la radiación ionizante de alta transferencia de energía lineal (LET) en la inducción de senescencia en líneas celulares de MU. En los trabajos publicados se mostraba como en la línea celular 92.1, a los 5 días postradiación se elevaban los niveles SA- $\beta$ -Gal. <sup>195</sup> La radiación ionizante del I<sup>125</sup> se clasificaría como radiación de alta LET, y al analizar en nuestro estudio si se presentaban diferencias en la inmunorreactividad de los marcadores entre los pacientes tratados previamente a la enucleación frente a los no tratados, no se ha detectado que existieran diferencias significativas en los marcadores estudiados en tejido, las medianas en cuanto a intensidad de marcadores eran idénticas en todos ellos, salvo en el Ki67; donde esta intensidad disminuía, aunque no existieran diferencias estadísticamente significativas.

Este marcador de proliferación celular, Ki67, ya había sido descrito en trabajos determinando la persistencia de células proliferantes en tejidos tumorales después de ser tratados con braquiterapia. Aunque la proliferación que presentaban los tumores radiados era menor que en los tumores no tratados, algo que concuerda con los resultados de esta tesis, ya que los MU tratados previamente presentan menor inmunorreactividad para Ki67 que los que fueron enucleados sin recibir tratamiento previo. <sup>206</sup>

Sin embargo, en nuestro estudio los niveles de p21 y p16 no variaban en el grupo de tratados comparándolo con el grupo de no tratados. Serían necesarios nuevos ensayos en tejidos, y realizar el estudio con un marcador como SA- $\beta$ -Gal; así como de otros marcadores del ciclo celular, para conocer los mecanismos que actúan en el daño celular y la génesis de senescencia tras el tratamiento con braquiterapia.

Además, sería necesario un análisis secundario que sólo incluyera en el grupo de pacientes tratados, aquellos que recibieron braquiterapia; ya que los resultados podrían verse afectados al existir un paciente que recibió TTT incluido entre los pacientes con tratamiento previo a la enucleación.

### 5.3. Análisis de supervivencia de los pacientes en función de los marcadores inmunohistoquímicos

Como se ha señalado, uno de los objetivos de este trabajo era conocer si la presencia de marcadores de senescencia podría asociarse a una diferencia en el pronóstico de supervivencia de los pacientes con MU. Aunque no se ha estudiado en profundidad el proceso de senescencia en este tumor, en otros cánceres como en el melanoma cutáneo se ha estudiado ampliamente la función de la senescencia celular; así los nevus cutáneos han sido las primeras lesiones en humanos en las que se han encontrado evidencias a favor de que la OIS (*Oncogen-induced senescence*) previene la progresión maligna al melanoma.<sup>207,208</sup> Se ha descrito como p16 podría contribuir al mecanismo de senescencia en nevus cutáneos, y como a través de la vía p16/Rb se podría suprimir la acción de la activación de mutaciones mitogénicas como BRAF, muy común en este tumor. De hecho, se han detectado por inmunohistoquímica zonas en los melanomas cutáneos que son activas para p16, p21, p53 y también tienen sobreexpresado CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*); estas regiones están asociadas a células grandes, pigmentadas y/o multinucleadas; dichas áreas pueden representar zonas residuales de senescencia (nevus), como restos de una parte de la evolución o formación del tumor.<sup>208</sup>

Al observar las piezas de MU en algunos casos se detectaron islotes de células con inmunorreactividad para p16, algo que se correlaciona con la heterogeneidad anatómopatológica del MU; correspondiendo a zonas que podrían presentar senescencia. Aunque los niveles de p16 no estén relacionados con un mejor pronóstico (no existe una tendencia clara, ni significativa), sí se ha observado que la mediana de la supervivencia

global ha sido superior en los tumores con inmunorreactividad para p16. Estos acúmulos celulares con positividad para p16 podrían tener una similitud a lo encontrado en el melanoma cutáneo, correspondiendo a zonas de senescencia que podrían pertenecer a un nevus coroideos, y estas células podrían haber entrado en estado senescente en la etapa de transformación nevus-melanoma, aunque se sabe que no es necesaria la presencia de un nevus previo para la formación de un MU; varios autores han descrito que la mayoría de MU derivan de un nevus preexistente.<sup>209,210</sup>

Además, estos islotes celulares dentro del tejido tumoral inmunorreactivos para p16 podrían ser una respuesta de OIS en tejido tumoral, dentro del estado senescente de la neoplasia, para prevenir el crecimiento tumoral, algo que ya se ha descrito en otros tumores, como en el cáncer de mama, donde la senescencia en células tumorales podría ser inducida o mantenida por las vías p16-Rb y ARF-p53.<sup>211</sup>

En cuanto a los valores de p21 aunque tampoco existe una diferencia significativa en la supervivencia, y además la positividad de este marcador ha sido reducida en esta serie de casos, aparece como la mediana de supervivencia global en pacientes con sobreexpresión de p21 es superior al grupo que presenta menos expresión.

Sin embargo, los resultados más llamativos son los que ofrece el marcador PTEN; de forma significativa los niveles elevados de PTEN se relacionan con una menor supervivencia en estos pacientes, algo contradictorio a lo que se encuentra en la literatura;<sup>212, 169, 170</sup> el PTEN es un supresor de la vía PI3K/Akt que ha sido descrita en la literatura por su importante papel en la senescencia; la pérdida de PTEN ha sido descrita en la neoplasia intraepitelial de próstata en ratones con características de senescencia.<sup>177,169</sup>

Y por otro lado en el MU, aunque el papel del PTEN no es claro, ya ha sido descrito en un estudio con 75 pacientes que la falta de inmunorreactividad para PTEN se asociaba a menor supervivencia.<sup>169</sup> En este trabajo, además de realizar un estudio IHQ, realizaron un estudio citogenético del PTEN en el MU y un análisis mutacional; encontrando casos de pacientes sin expresión de PTEN pero con alta tasa de SLE (supervivencia libre de enfermedad), lo que sugieren estos autores es la posibilidad de existencia de otras

alteraciones moleculares predominantes sobre la vía de PTEN que expliquen la variación en la supervivencia; o de otras alteraciones que contrarresten el efecto de la ausencia de PTEN.<sup>169</sup>

Cabe señalar que se ha estudiado el concepto de que en las células somáticas no tumorales el PTEN se localiza predominantemente en el núcleo, pero en células tumorales suele ser citoplasmático.<sup>213</sup> Esta repartición del PTEN depende de modificaciones postraduccionales de ubiquitinilación y sumoylacion.<sup>214</sup> Podría suceder que en este trabajo, donde no se ha discriminado la inmunorreactividad de PTEN entre los niveles nucleares y niveles citoplasmáticos, se produzca una distorsión en los resultados, por lo que sería necesario un estudio diferenciando la expresión de la localización de la proteína.

Así mismo estos factores podrían estar influenciando la relación entre p21 y PTEN, que presentaban una correlación moderada.

En cuanto al estudio iniciado con el marcador SA- $\beta$ -Gal, parece ser un ensayo prometedor en estudio de tejido fresco, y también en cultivos primarios, donde sí existe positividad para este marcador de senescencia.

En resumen, los resultados obtenidos con los valores de PTEN deberían de ser tomados con cautela; así, sería recomendable realizar estudios de determinación de PTEN que pudieran detectar la expresión de la proteína con sus cambios postrasduccionales, o la determinación de la expresión génica. Además, se podría ampliar el análisis inmunohistoquímico y realizar un subanálisis en función de la localización, nuclear o citoplasmática, de la expresión de PTEN.

Además desde el punto de vista clínico, en cuanto a la hora de realizar los análisis de supervivencia, hay que tener en cuenta que la población de MU estudiada es, ya de por sí una población sesgada, dado que se trata de tumores grandes que precisaron una enucleación de inicio o tumores que han crecido tras un tratamiento local; por lo que el

pronóstico vital o de diseminación de estos pacientes puede ser peor dada las características de la lesión tumoral.

Los resultados preliminares presentados en esta tesis indican la necesidad de ampliar el trabajo con un mayor número de casos. Sería útil añadir otros factores pronóstico conocidos para MU en el estudio, tanto clínicos como anatómo-patológicos, como la clasificación histológica, el número de mitosis, los patrones de matriz extracelular; y por supuesto correlacionarlo con los factores de riesgo moleculares, abriendo un nuevo estudio prospectivo que correlacione los marcadores estudiados por inmunohistoquímica con los test pronósticos empleados en la actualidad basados en las anomalías cromosómicas que permiten clasificar aquellos pacientes con mayor riesgo de padecer metástasis.







## Capítulo 3:

Caracterización del secretoma y proteoma de las vesículas extracelulares liberadas por el melanoma uveal

---







# Capítulo 3: Caracterización del secretoma y proteoma de las vesículas extracelulares liberadas por el melanoma uveal

## 1. Introducción

### 1.1. Proteómica aplicada al estudio del MU

El término proteoma se usó por primera vez en 1995 para describir el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma; pero su acepción más precisa es la que se refiere al conjunto de proteínas que componen una célula, tejido, organismo o fluido biológico en un momento dado, incluyendo todas las modificaciones post-traduccionales como glucosilaciones y fosforilaciones.<sup>215</sup>

Muchas de las enfermedades humanas se producen por una desregulación funcional de las interacciones proteicas; así se postula que un mejor conocimiento del comportamiento de las diferentes redes de proteínas aportará nuevas dianas terapéuticas, ya que estas redes se podrían convertir en objetivos farmacológicos en las próximas décadas. La Proteómica clínica supone la aplicación de técnicas y estrategias proteómicas en la Medicina. Es ya una realidad en el tratamiento de muchas enfermedades que las estrategias terapéuticas estén diseñadas no solo frente a una proteína aislada, sino frente a un conjunto de proteínas afectadas. La importancia actual de la Proteómica en la clínica es fundamental para el descubrimiento de marcadores biológicos de diversas enfermedades, permitiendo la detección temprana de elevaciones

o disminuciones de ciertos péptidos en fluidos biológicos relacionados con una enfermedad, antes incluso de que ésta llegue a manifestarse.<sup>216</sup>

En 2005 Pardo *et al.* presentaron el primer estudio del análisis del proteoma completo del melanoma de úvea (MU) en un cultivo celular primario de este tumor (UM-A). En este estudio, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis bi-dimensional en geles (2-DE) donde se pudieron analizar 270 spots mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masas (LC-MS/MS). Se identificaron 683 proteínas derivadas de 393 genes, de las cuales 69 (18%) estaban relacionados con procesos oncogénicos como proteínas implicadas en la división celular, proliferación, invasión, metástasis, resistencia a drogas, etc.<sup>134</sup> La publicación de estos hallazgos constituyó por primera vez la utilización de la Proteómica para el estudio del MU.

En un trabajo posterior de los mismos autores se realiza un análisis diferencial comparando el proteoma del cultivo celular primario de UM-A (< pase 7 in vitro) con la línea celular resultante al cultivar las células del tumor primario durante más de siete pases (UM-A > pase 7) caracterizada por un mayor potencial invasivo.<sup>136</sup> El análisis comparativo mediante 2-DE y LC-MS/MS de ambos tipos celulares muestra que 290 proteínas diferenciaban estos cultivos con un aumento de proteínas del metabolismo celular en células más invasivas (UM-A >p7), además de diferencias en proteínas asociadas al cáncer implicadas en adhesión y migración celular como MUC18 y HMG-1, proliferación, y varios oncogenes como DJ1/PARK7. Se validó por inmunodetección en las células UM-A, y en otras cinco líneas celulares de melanoma uveal establecidas por otros autores, la expresión de MUC18 y HMG-1.<sup>136</sup> Se encontró una correlación positiva entre la capacidad invasiva en matrigel con los niveles de expresión de MUC18; sin embargo, los niveles de HMG-1 se encontraron elevados en todas las líneas celulares estudiadas sin correlación con la invasión. La caracterización posterior de las proteínas secretadas de UM-A, y de las otras líneas celulares previamente establecidas, detectó entre otras la proteína melanocítica PMEL/ME20-M también conocida como el antígeno asociado a melanoma gp100 (ME20-S) y la cathepsina D postulándose como posibles biomarcadores.<sup>135</sup>

Finalmente, estudios recientes a nivel traslacional confirmaron que los niveles circulantes de DJ-1 en pacientes con nevus coroideo muestran una asociación significativa positiva con factores de riesgo de transformación maligna, además de una tendencia al alza en relación directa con el aumento de la altura del nevus coroideo hasta los 2 mm.<sup>137</sup> Por otro lado, el análisis de los niveles séricos de ME20-S mostraban un aumento significativo en los pacientes con MU no tratado y en los pacientes con enfermedad metastásica; hallándose una correlación positiva entre los niveles de ME20-S en suero y la altura del tumor en los pacientes de MU sin tratar y aquellos con extensión extraescleral.<sup>217</sup> Así, los resultados de los análisis de DJ-1 y ME20-S a nivel circulante en pacientes con lesiones melanocíticas uveales sugieren a DJ-1 como biomarcador indicativo de riesgo de transformación maligna en aquellos pacientes con nevus coroides, y a ME20-S como potencial biomarcador de progresión tumoral en los pacientes con melanoma uveal. Los niveles circulantes de ME20-S podrían ser de utilidad para monitorizar la respuesta al tratamiento y permitir la detección temprana de metástasis.

Posteriormente Zuidervaart *et al.* analizaron mediante electroforesis bi-dimensional (2-DE) el proteoma de dos líneas celulares metastásicas y una línea celular primaria del mismo paciente encontrando 24 proteínas expresadas de forma diferente en las dos líneas metastásicas comparado con la línea celular derivada del tumor primario como heat-shock  $\alpha\beta$ -crystallin, cofilina y HSP27.<sup>218</sup> Además, mencionar que se han realizado estudios de marcaje isotópico (SILAC) seguido de 2DE MALDI MS/MS para el estudio del proteoma del cultivo celular de MU 92.1 con y sin radiación.<sup>194</sup>

En cuanto a estudios en tejido tumoral, se ha hecho un análisis proteómico diferencial en gel 2-DE de tejido tumoral de dos cohortes de pacientes con MU, una con monosomía 3 y otro sin monosomía 3, encontrando diferencias en la expresión de HSP27. En concreto se describe una correlación entre la expresión baja o nula de esta proteína con la monosomía 3.<sup>219</sup> En otro estudio con tejido de MU<sup>220</sup> se hizo un análisis cuantitativo con 2D-DIGE para encontrar diferencias entre tumores de pacientes que desarrollaron metástasis y pacientes que tras siete años de seguimiento no desarrollaron enfermedad a

distancia. Entre las proteínas que se encuentran sobreexpresadas está el PARK7 (DJ-1) que ha sido objeto de estudio en el capítulo 1; además los autores destacan las proteínas FABP3 y TPI1 que tendrían un papel en la invasión en estudios *in vitro*. En otro estudio diferencial entre tejido tumoral de pacientes metastásicos y no metastásicos usando una técnica proteómica más avanzada (*label-free* LC-MS/MS) se encuentra sobreexpresión de DJ-1, FABP3 y disminución de HSP-27.<sup>221</sup>

## 1.2. Secretoma

El término secretoma engloba todas las proteínas liberadas por una célula, tejido u organismo al medio extracelular, a través de mecanismos de secreción clásicos y no clásicos.

En el mecanismo clásico (Fig. 31), las proteínas, tras ser sintetizadas se translocan al lumen del retículo endoplasmático, luego son transportadas a través del aparato de Golgi, para ser liberadas por exocitosis.<sup>222</sup> Estas proteínas se expresan a partir de un mRNA que tiene una secuencia señal que guía el paso del ribosoma a la membrana del retículo endoplasmático e inicia el transporte del péptido hacia el lumen del retículo endoplasmático. Esta secuencia señal se compone de uno o más aminoácidos que tienen carga positiva, seguidos de una cadena continua de 6 a 12 residuos hidrofóbicos; la secuencia señal no se encuentra en el péptido final porque se suele cortar en los ribosomas.

Mientras, en las vías no clásicas de secreción, no se produce el paso de los péptidos a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi; el mecanismo exacto por el que se regula esta vía de secreción es todavía poco conocida.<sup>223</sup>

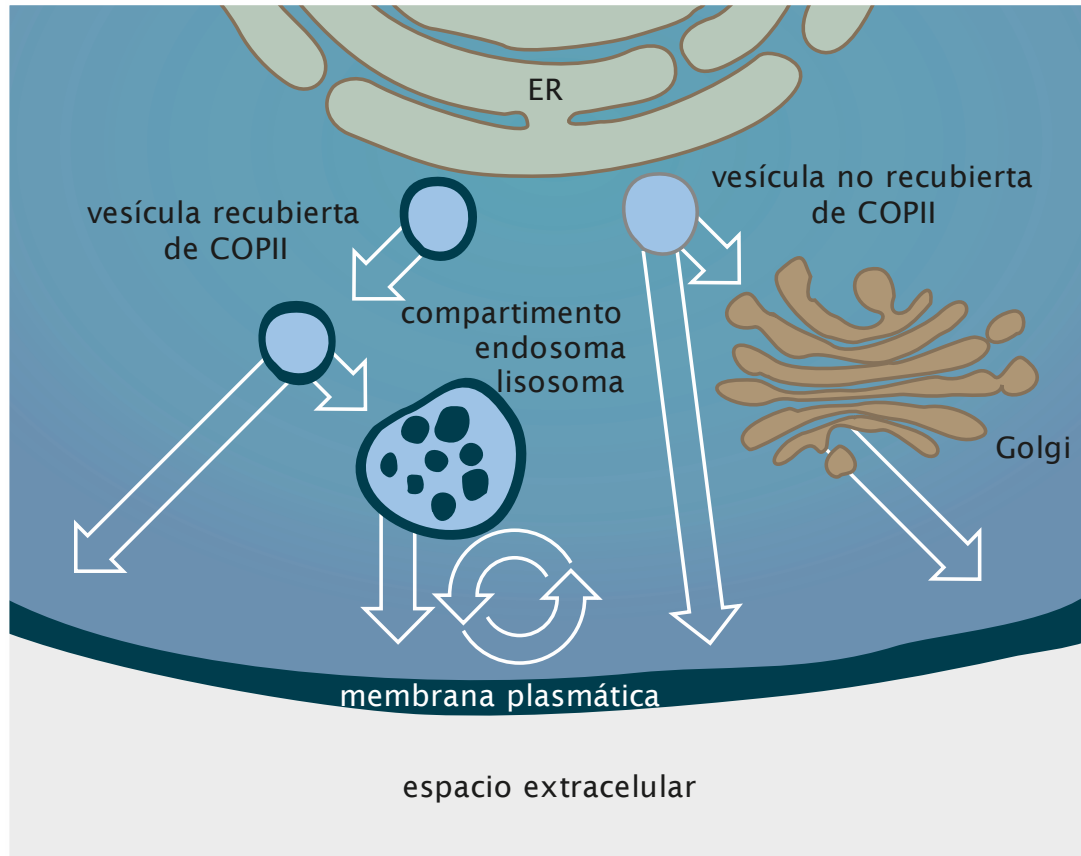


Figura 31: Rutas esquemáticas de secreción clásica a través del retículo endoplasmático. Modificado de Nickel *et al.*<sup>223</sup>

Se han descrito hasta cinco rutas de secreción no clásica:

- Translocación directa a través de la membrana plasmática.
- A través de la secreción de vesículas lisosomales al medio extracelular.

- Liberación de vesículas intracelulares que probablemente provienen de subcompartimentos endosómicos.
- A través de exosomas que liberan su contenido en el espacio extracelular.
- Translocación mediada por transportadores a través de un sistema de membrana tipo *flip-flop*.

Las proteínas que conforman el secretoma tienen un importante papel en la comunicación intercelular y en el desarrollo y progresión del cáncer. Pero, además, en estudios exhaustivos de metodología de secretomas se encontró que una parte importante de las proteínas secretadas se secreta a través de la vía no clásica a través de exosomas y otras vesículas. Además se demostró que algunas proteínas nucleares cambian su localización celular en tumores, como en el cáncer de mama; explicando su presencia en secretomas, y sugiriendo que las células tumorales usan este tipo de secreción no clásica durante los procesos de tumorigénesis. Así, la secreción no convencional de las proteínas al espacio extracelular plantea un nuevo espacio en la regulación post-transduccional del genoma y nos revela una fuente de posibles biomarcadores tumorales y posibles dianas terapéuticas.<sup>224</sup>

El secretoma de células en cultivo es un sistema simplificado del complejo microambiente tumoral; en contrapunto evita la complejidad proteica del suero y plasma aumentando la probabilidad de identificar proteínas directamente afectadas en la señalización intracelular del tumor. Además puede ser utilizado para verificar y caracterizar los efectos de los fármacos sobre los biomarcadores.<sup>225,226,227,228</sup>

### 1.3. Secretoma del melanoma uveal

Como se menciona en el inicio de esta introducción, el primer trabajo analizando el secretoma celular de MU fue publicado por Pardo *et al.*, en 2007. En este trabajo, entre otras, se detectó la presencia de PMEL/ME20-S y la Cathepsina D.<sup>135</sup> Recientemente, se ha

estudiado el secretoma de MU <sup>229</sup> en cultivos primarios de tumores clasificados en dos grupos, uno de bajo y otro de alto riesgo de metástasis comparados con un tercer grupo de melanocitos normales usando técnicas *label-free* nanoLCMS/MS. Se identificaron 1843 proteínas con un 1% de falsos positivos. Las proteínas detectadas fueron clasificadas según el mecanismo de secreción: vía clásica (19%), no clásica (6%) o exosomal (46%). Se detectaron proteínas relacionadas con la proliferación, crecimiento y movimiento celular.

## 1.4. Vesículas Extracelulares (VEs)-Exosomas:

Las VEs incluye vesículas de tamaño y origen variable (30-1000 nm); así las originadas por la evaginación de la membrana plasmática son conocidas como microvesículas (100 nm-1µm) y las ensambladas en endosomas multivesiculares y secretadas por exocitosis (30-100 nm), exosomas <sup>230</sup> (Fig. 32); por lo tanto, estas vesículas están potencialmente presentes en todos los fluidos biológicos. El interés en las VEs y en particular en los exosomas se ha intensificado exponencialmente en los últimos años debido a su capacidad de transportar una variedad de componentes moleculares procedentes de la célula de origen como proteínas, lípidos, ARNms y micro ARNs. <sup>231</sup> Además, es bien conocida su capacidad de presentar antígenos y estimular la respuesta inmune. Estas vesículas son liberadas por una gran variedad de tipos celulares como células dendríticas, linfocitos, plaquetas, mastocitos, células epiteliales y endoteliales, y neuronas, y están presentes en la mayoría de los fluidos biológicos incluida la sangre, orina, saliva, líquido amniótico, leche materna, líquido pleural y ascítico, y también en el medio de cultivo de la mayoría de los tipos celulares. <sup>232</sup> Cada vez hay más estudios que muestran un papel importante de los exosomas mediando la comunicación intercelular en condiciones normales y patológicas. Es interesante destacar que esta comunicación implica diferentes mecanismos como la fusión de los exosomas con células receptoras para liberar su contenido o su internalización en las mismas. <sup>233</sup> Se han descrito una gran variedad de funciones para los exosomas que depende del tipo celular de origen; así, los exosomas

liberados por células inmunes como las células dendríticas y células B, pueden mediar una respuesta inmune adaptativa a patógenos y a tumores.<sup>234</sup>

En concreto, se ha visto que los exosomas liberados por células tumorales juegan un papel muy activo en la tumorigénesis, metástasis y respuesta a terapia a través de la transferencia de oncogenes y onco-miRNAs entre células cancerígenas y el estroma tumoral.<sup>235</sup> Así, es cada vez más evidente el papel que juegan los exosomas liberados por el tumor primario en la formación del nicho pre-metastático y en la propia metástasis.<sup>236</sup>

Además, se ha visto que los exosomas liberados a partir de células sanguíneas estimuladas y del endotelio vascular están implicados en desórdenes neurológicos como la esclerosis múltiple, ataques isquémicos transitorios, y síndrome antifosfolípido.<sup>237</sup> Es interesante destacar estudios muy recientes que han mostrado que los exosomas son utilizados por patógenos como priones y virus para transformar moléculas de origen patológico a células huésped y por tanto estarían implicados en la diseminación viral y en la evasión inmune.<sup>238</sup> Además distintas evidencias sugieren que los exosomas podrían tener un rol en la regulación post-transcripcional sobre la expresión de ARNm a través de miRNAs que inducirían cambios de expresión de proteína en un gran número de genes.<sup>239</sup> Como la composición molecular de los exosomas refleja cambios fisiológicos y patofisiológicos de la célula o tejido de origen, los exosomas tienen un gran potencial como biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad.

Bajo el contexto anterior, los exosomas y otras partículas extracelulares como las microvesículas se postulan como potenciales biomarcadores muy tempranos, con una alta probabilidad de predicción, y facilidad de aislamiento para su estudio. Esta expectativa se basa en:

- La estructura y la composición de estas vesículas: contiene mRNA que codifica biomarcadores, citoquinas biomarcadoras, proteínas de señalización, receptoras, transportadoras y enzimas.



- Su función como transportadores de información intercelular en procesos patológicos.
- Lo sensible que es su liberación a la circulación a estímulos ambientales desde virtualmente cualquier tejido u órgano.
- La accesibilidad y facilidad de detección y la posibilidad de hacer su análisis en el plasma.

A medio plazo será muy importante identificar correlaciones significativamente y fisiológicamente relevantes entre las vesículas extracelulares y el tumor en sus diferentes estadios.

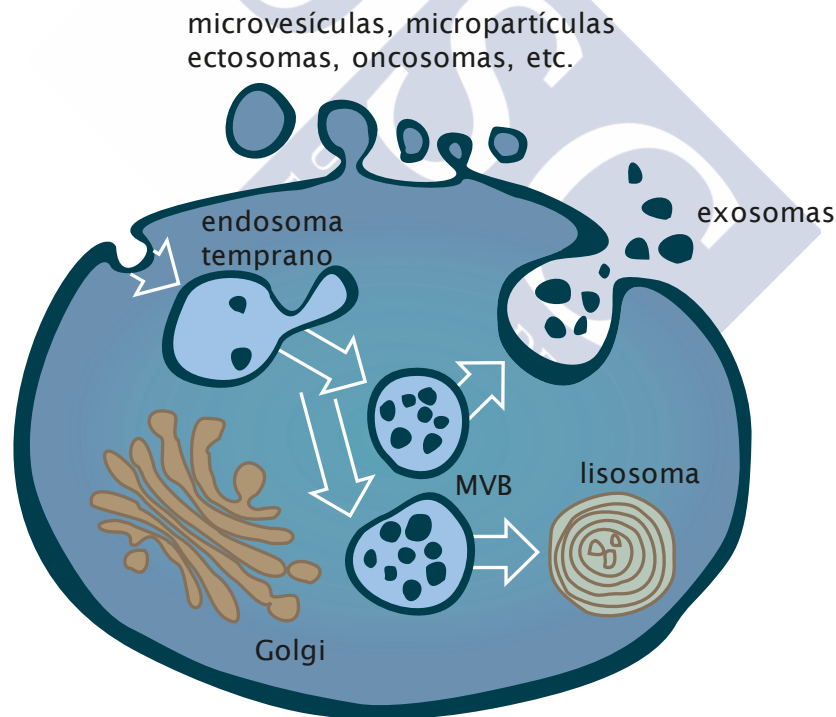


Figura 32. Esquema de la formación de exosomas y microvesículas, modificada de Colombo *et al.*<sup>240</sup>

## 1.5. Exosomas en melanoma uveal

Apenas existen dos trabajos analizando exosomas en pacientes de melanoma uveal; uno sobre exosomas aislados directamente de la circulación hepática en pacientes metastáticos de MU, y otro aislando los exosomas del humor vítreo y del suero.<sup>241,242</sup> Hasta la fecha no existen trabajos aislando exosomas directamente de la masa tumoral o de células en cultivo. En los trabajos mencionados se ha detectado el miR146a como posible biomarcador ya que además de presentarse a niveles elevados en el vítreo, se encontraba elevado en el suero y en exosomas aislados del suero de estos pacientes.<sup>242</sup> Por otro lado, en el líquido de perfusión hepático en pacientes de MU con metástasis en hígado, se encontró que los exosomas presentaban perfiles de miRNAs similares entre pacientes pero diferentes de los que presentaban los exosomas de cultivos celulares de otros tipos tumorales. Además los pacientes con metástasis presentaban niveles más elevados de exosomas en sangre periférica que los controles sanos.<sup>241</sup>

## 1.6. Proteómica cuantitativa para el análisis del proteoma y secretoma-marcaje SILAC (*Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) y CILAIR (*Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates*).

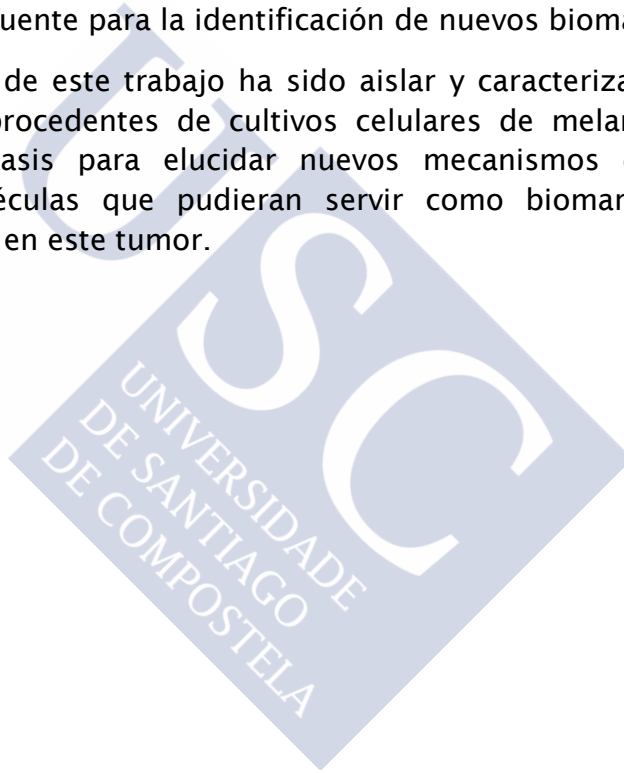
El análisis cuantitativo mediante la incorporación de aminoácidos marcados permite discernir la síntesis y secreción de proteínas *de novo*, pudiendo así identificar correctamente las proteínas realmente secretadas de las contaminantes procedentes de rotura celular o del medio de cultivo. Este método es extremadamente preciso y sencillo de aplicar para la cuantificación de extractos proteicos procedentes de cultivos celulares. Se basa en la comparación de cultivos celulares que usan un medio de cultivo normal (sintetizándose proteínas “ligeras”) frente a cultivos celulares incubados en medio en el cual algunos aminoácidos, normalmente Lisina (Lys) y Arginina (Arg), han sido reemplazados por sus equivalentes isótopos marcados (dando lugar a proteínas “pesadas”). La incorporación de estos aminoácidos proporciona un incremento conocido

en la masa del péptido en comparación con la del péptido con los aminoácidos ligeros, que no puede ser atribuida a ningún otro cambio químico. La gran ventaja es que ambas situaciones celulares pueden ser comparadas como si se tratase de una muestra única mediante su mezcla, evitándose el riesgo de producirse errores de cuantificación durante la preparación de la muestra. Durante el análisis de espectrometría de masas, la abundancia relativa de una proteína concreta en ambas muestras, puede ser calculada por las intensidades observadas de los péptidos pesados y ligeros; el software de análisis utilizará estas intensidades para realizar la cuantificación.<sup>243,244</sup> Como el marcaje SILAC (*Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture*) requiere realizar varios pases celulares y sólo puede ser aplicado a células en cultivo, se ideó una modificación de la técnica para poder ser aplicada a cultivos y explantes de tejido en un tiempo fijo. Esta nueva técnica, denominada CILAIR del inglés *Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates*, se basa en añadir los aminoácidos marcados al medio de cultivo durante un tiempo fijo, normalmente 72 horas, en este caso la cuantificación se realiza comparando los péptidos marcados con los mismos péptidos existentes en el medio sin marcar, lo que permite ver la tasa de síntesis de las proteínas en ese tejido.<sup>245</sup>

## 2. Objetivo

En cáncer, las vesículas extracelulares (VEs) han recibido en los últimos años gran atención por su papel mediador en rutas de señalización intercelular favoreciendo la progresión tumoral y como fuente para la identificación de nuevos biomarcadores.

Es por ello, que el objetivo de este trabajo ha sido aislar y caracterizar microvesículas-exosomas en secretomas procedentes de cultivos celulares de melanoma uveal y de líneas celulares de metástasis para elucidar nuevos mecanismos de comunicación tumoral, e identificar moléculas que pudieran servir como biomarcadores o como posibles dianas terapéuticas en este tumor.



### 3. Material y métodos

#### 3.1. Marcaje CILAR y SILAC

Se usaron las líneas celulares procedentes de un tumor primario de MU, UM-A o metastásicas a nivel subcutáneo (OMM 1) y en el hígado (OMM 2.5); estas últimas procedentes del tumor primario MEL270. OMM1 y OMM2.5 fueron donadas amablemente por la Prof. Coupland, Liverpool, UK y Dra. Jager, Leiden, Holanda. Sobre estas células se pusieron a punto dos métodos de Proteómica cuantitativa SILAC y CILAIR (Fig. 33 y 34), con el fin de determinar su utilidad para el estudio del secretoma y de las vesículas extracelulares liberadas de las células en cultivo.

Marcaje CILAIR: Las células UM-A fueron marcadas mediante CILAIR durante 72 horas para el estudio de exosomas con lisina-*heavy-labelled lysine* (L-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-Lys, Silantes, Germany) y arginina-*heavy-labelled arginine* (L-[ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ]-Arg, Silantes, Germany). Para el protocolo CILAIR se realizaron lavados de las células UM-A en cultivo con PBS, para retirar el mayor número posible de proteínas contaminantes que pudieran aparecer sin marcaje, para posteriormente proceder al marcaje con medio DMEM libre de arginina y lisina (Silantes, München, Germany), con 50 mg/ml penicilina-estreptomicina y enriquecido con lisina-*heavy-labelled lysine* (L-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-Lys, Silantes, Germany) y arginina-*heavy-labelled arginine* (L-[ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ]-Arg, Silantes, Germany) durante 72 horas, comparándolo con los restos de proteínas no marcadas del medio.

Marcaje SILAC: Se usó esta metodología para el estudio del secretoma de UM-A y para el análisis de los exosomas liberados por OMM1 y OMM2.5. En este caso el marcaje se realizó con lisina-*heavy-labelled lysine* (L-[ $^{13}\text{C}_6$ ]-Lys, Silantes, Germany) y arginina-*heavy-labelled arginine* (L-[ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ]-Arg, Silantes, Germany) en OMM2.5, o con Lysina y Arginina “light” en OMM 1. Para conseguir el marcaje SILAC tanto en UM-A como en OMM 1 y OMM 2.5, las células fueron incubadas durante 5 pases con los aminoácidos “light” o “heavy” en

medio DMEM libre de arginina y lisina (Silantes, München, Germany) o RPMI (Silantes, München, Germany), con 10% Suero Fetal Bovino (Silantes, München, Germany), y 50 mg/ml penicilina-estreptomicina. Los secretomas de las células marcadas con SILAC se recogieron tras 48 horas usando medio SILAC libre de FBS con marcaje de los aminoácidos.

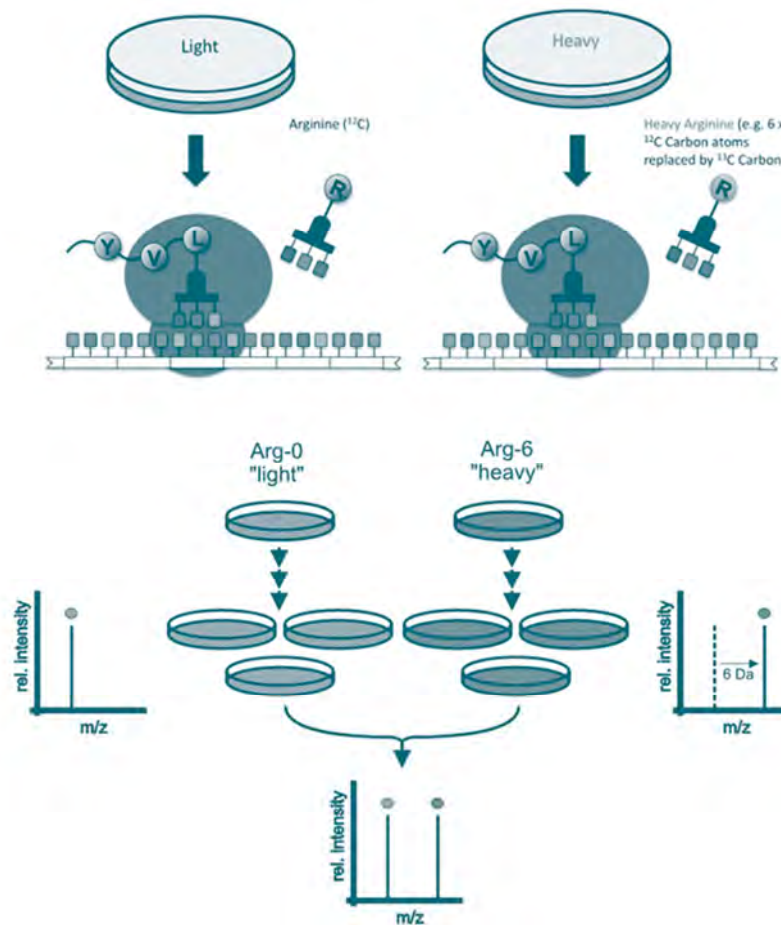


Figura 33. Esquema representativo del marcaje SILAC, modificado de Roelofsen *et al.*<sup>245</sup>

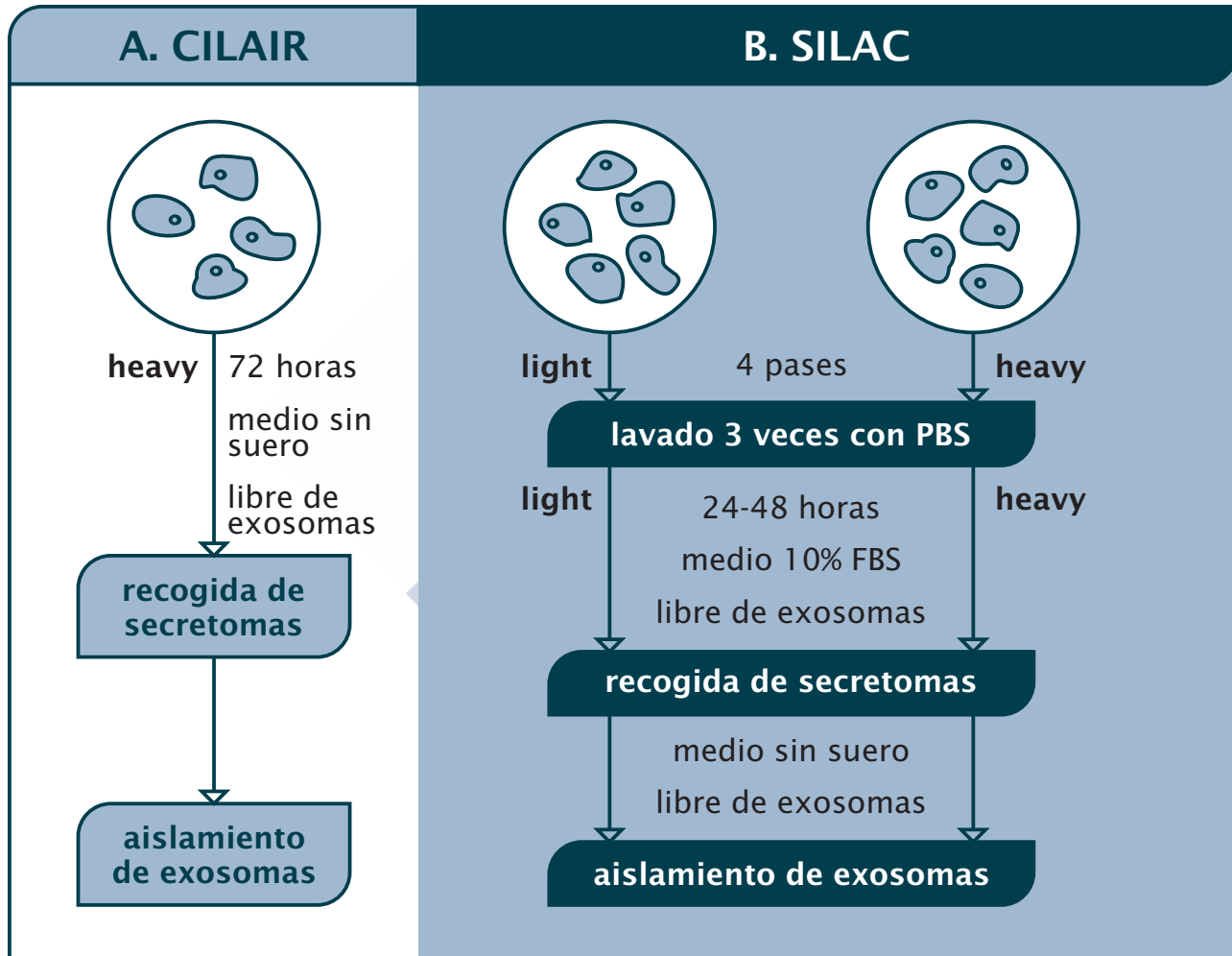


Figura 34. Protocolo de Marcaje CILAIR y SILAC en cultivos celulares de líneas metastásicas de MU

## 3.2. Aislamiento y caracterización de exosomas a partir de secretomas

### 3.2.1. Ultracentrifugación del secretoma

Se centrifugaron los secretomas a 1800 rpm 5 minutos a temperatura ambiente, recogiendo el sobrenadante y conservándolo hasta su uso a -80°C. Para aislar los exosomas, se ultracentrifugó el secretoma de las células a 200.000 g durante 90 minutos a una temperatura de 4°C; posteriormente se realizó una segunda a la misma velocidad, duración y temperatura tras el lavado del pellet con PBS. Se recogió el pellet en tampón de lisis RIPA, con antifosfatasa y antiproteasas comerciales a una dilución 1/100 (Ref. P0044 y P8340 Sigma-Aldrich, MO, EEUU] para la estudios de proteína mediante inmunodetección por *Western-blot* y para los análisis por espectrometría de masas; en glutaraldehído al 25% para los estudios por microscopía electrónica, y en PBS los estudios de dispersión dinámica de la luz.

Tampón de lisis RIPA

- Tris pH 7.4 200mM
- NaCl 130 mM
- Glicerol 10%
- SDS 0.1 %
- Tritón X-100 1%
- $MgCl_2$  10 mM

### 3.2.2. Dispersión dinámica de luz (*Light scattering*):

El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad se midieron por espectroscopía de correlación de fotones usando un Zetasizer Nano- S (Instrumentos Malvern; Malvern, UK).



### 3.2.3. Caracterización por microscopio electrónico de transmisión (TEM)

La visualización por microscopio electrónico se realizó en el Servicio de Microscopia de la Universidad de Santiago. Se depositó una gota de la muestra sobre una rejilla con película donde se realizaron tres lavados con agua destilada y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2%. Se observaron en un microscopio electrónico de transmisión: TEM JEOL 1011 a 90KV.

### 3.3. Análisis proteómico

Todas las técnicas que se describen a continuación fueron hechas en la Unidad de Proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago (IDIS), en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, según los protocolos establecidos por la Unidad. En concreto los pasos previos a la identificación por espectrometría de masas se realizaron en la sala blanca de dicha unidad bajo presión positiva minimizando así la contaminación de las muestras por queratinas de la piel/pelo, u otras proteínas que podrían enmascarar la identificación de las proteínas a estudio.

#### 3.3.1. Preparación de la muestra

Se cuantificó la proteína de cada muestra con el kit comercial RC DC Protein Assay (BioRad Lab, CA, EEUU), y se cargaron 200 µg de proteína en un gel 10% SDS-PAGE. La electroforesis se detuvo cuando el frente entró 3 mm dentro del gel de resolución consiguiendo así concentrar toda la muestra en una sola banda. <sup>246,247</sup>

A continuación, los geles fueron teñidos con *Coomasie* (SERVA, Alemania) para visualizar la banda y cortar el fragmento de gel con las proteínas de interés. Los trozos de gel se pasaron a tubos eppendorf individuales con 100 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura.

### 3.3.2. Digestión

Antes de poder realizarse la identificación mediante el espectrómetro de masas fue necesario hacer una serie de modificaciones y realizar una digestión peptídica de las proteínas dentro del mismo gel. Dichas modificaciones son la reducción de puentes disulfuro y la alquilación de las cisteínas; de esta forma las proteínas quedan desnaturalizadas mostrando los sitios de corte para la digestión enzimática y también evitando la formación de dímeros. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Se realizaron 3 lavados de 30 minutos cada uno con 190 µl de una solución de bicarbonato amónico 50 mM (Sigma-Aldrich, MO, EUA) y metanol 50% de grado HPLC (Scharlau, España) (solución de lavado) si la tinción fue realizada con azul de Coomassie. Posteriormente se dejaron 5 minutos en 50 µl de acetonitrilo 100% de grado HPLC (Scharlau, España) para deshidratar los geles y se secaron mediante una centrifuga de evaporación al vacío (*Savant SpeedVac Concentrator*, Thermo Scientific, MA, EEUU) (figura 40B).
- Se redujeron los posibles puentes disulfuro de la muestra mediante una incubación de 30 minutos a 56°C con 50 µl de ditioneol 10 mM (Sigma-Aldrich, MO, EEUU) en bicarbonato amónico 50 mM. Tras esto se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con 190 µl de la solución de lavado, para luego volver a incubar la muestra 5 minutos con 50 µl de acetonitrilo 100% y se deshidrató la muestra.
- Una vez deshidratada, la muestra se incubó 20 minutos en oscuridad con 40 µl de yodoacetamida 55 mM (Sigma-Aldrich, MO, EEUU) en bicarbonato amónico 50 mM para producir la alquilación de las cisteínas. Posteriormente se repitieron los pasos de lavado y deshidratación comentados arriba.
- Se añadió tripsina porcina 20 ng/µl (Promega, WI, EEUU) en bicarbonato amónico 20 mM y se incubó a 37°C durante toda la noche.

- Tras la digestión, se extrajeron los péptidos resultantes con una solución de acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0.5% (Scharlau, España). Este paso se realizó 3 veces para obtener la mayor cantidad posible de péptidos (35-40-35  $\mu$ l). Entre cada extracción se incubaron las muestras 20 minutos con la solución.
- Finalmente se unieron las tres extracciones peptídicas, se concentraron al vacío y se guardaron a -20°C hasta su uso.

### 3.3.3. Identificación de proteínas: nano HPLC y espectrometría de masas (LC-MS/MS)

La separación de las mezclas de péptidos se realizó mediante LC-MALDI-MS/MS de fase reversa a nanoescala con un nanoLC Ultra 1D plus (Eksigent, ABSciex Boston, EEUU) acoplado a un MALDI TOF/TOF (Eksigent, ABSciex). Las mezclas de péptidos se redisolviaron en 0,1% de ácido fórmico, 2% de ACN y se inyectaron en la columna (ChromXP nanoLC Trap column 350  $\mu$ m id x 0.5 mm, ChromXP C18 3  $\mu$ m 120Å, ABSciex) a un flujo de 10  $\mu$ l/minuto. Después de 15 minutos los péptidos atrapados se separaron en una nanocolumna (ChromXP nanoLC column 75  $\mu$ m id x 15 cm, ChromXP C18 3  $\mu$ m 120Å, ABSciex) a un flujo de 300nL/minuto en una elusión de gradiente lineal desde 95% A (0,1% ácido fórmico 2% ACN) a 60% B (90% ACN, 0,1% ácido fórmico) en 80 minutos seguido por un incremento a 95% B en 5 minutos. Los péptidos se mezclaron con la solución matriz, que constaba de 3 mg de  $\alpha$ -CHCA (alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid) disuelto en 1 ml de ACN al 50% en ácido trifluoroacético al 0,1% y 10fmol/ $\mu$ L de angiotensina; utilizada como péptido de calibración interna, y depositado sobre un inserto Opti-TOF LC/MALDI (ABSciex) a una velocidad de un spot por cada 12 segundos.

Los datos de espectrometría de masas fueron obtenidos automáticamente utilizando un *4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer* (Applied Biosystems, CA, EEUU) con fuente de ionización MALDI (desorción/ionización láser asistido por matriz). Los espectros de masas (MS) se adquirieron en modo reflector positivo con un láser Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) de 355 nm. La media de disparos del láser por muestra fue de 1000 y

se utilizó el pico 1296.685 angiotensin I (Sigma) como calibración interna. Todos los espectros de fragmentación MS/MS fueron realizados tras seleccionar los precursores con una resolución 300 FWHM ("Full Width High at Half Maximum") y la supresión de metaestables.

El análisis automático de los datos obtenidos se realizó mediante el software *4000 Series Explorer Software v3.5* (Applied Biosystems, CA, EUA). Los datos de los espectros de MS y MS/MS se combinaron a través del *Protein Pilot Software v4.0.80.85* que usa el algoritmo *Paragon* para realizar la búsqueda en una base de datos no-redundante (SwissProt release 56.0), restringiendo la búsqueda contra la base de datos de humano con una tolerancia de 30 ppm para la masa del péptido y 0,35 Da de tolerancia para los fragmentos peptídicos resultantes, y permitiendo un único defecto de corte de la tripsina (misscleave). Todos los espectros y datos obtenidos fueron revisados manualmente en detalle usando los softwares previamente citados. Los valores de detección obtenidos por identificación superiores a 56 fueron aceptados como significativos ( $p < 0.05$ ), considerando positiva la identificación cuando el coeficiente de intervalo se encontraba por encima del 98%. En el caso de los espectros MS/MS, el porcentaje de confianza aceptado se dispuso por encima del 95%. El software automáticamente detecta los aminoácidos con los marcajes heavy/light y calcula los ratios H/L.

#### 3.3.4. Análisis funcional de proteínas

Una vez obtenidos los resultados de MS/MS se emplearon distintas bases de datos para su análisis funcional. Los códigos de las distintas proteínas identificadas por espectrometría de masas se introdujeron en el buscador de la *Universal Protein Resource* (UniProt: <http://www.uniprot.org/>) obteniendo la secuencia de la proteína en formato FASTA (formato basado en texto para representar secuencias de nucleótidos). Esta secuencia se empleó para hacer búsquedas en el servidor SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) para la clasificación de las proteínas identificadas como potencialmente secretadas. Para cada secuencia de entrada (formato

FASTA) el servidor predice la posibilidad de secreción no clásica dando puntuación alta a las proteínas de la vía secretora clásica (aquellas proteínas con péptido señal). Las proteínas no secretadas clásicamente deben obtener un NN-score superior al umbral de 0,6. También se usó el software *FunRich* (*Functional Enrichment analysis tool*) para examinar la función y posibles interacciones entre todas las proteínas identificadas. Esta herramienta comprende su análisis con bases de datos como SMART, Gene Ontology database (HPRD), Entrez Gene, Uniprot, BioGRID, Human Proteinpedia, Human Protein Atlas, Human Proteome Browser, Human Proteome Map, ProteomicsDB, Reactome, NCI, Cell map, HumanCyc, OMIM, PRIDE, PeptideAtlas, Peptidome, HPA, Colorectal cáncer Database, Plasma Proteome Database y PHosphositePlus<sup>248,249</sup>. En relación a este trabajo de tesis, esta herramienta es particularmente útil al contener la información sobre partículas extracelulares en ExoCarta y Vesiclepedia: <http://exocarta.org/>, <http://www.microvesicles.org/>.

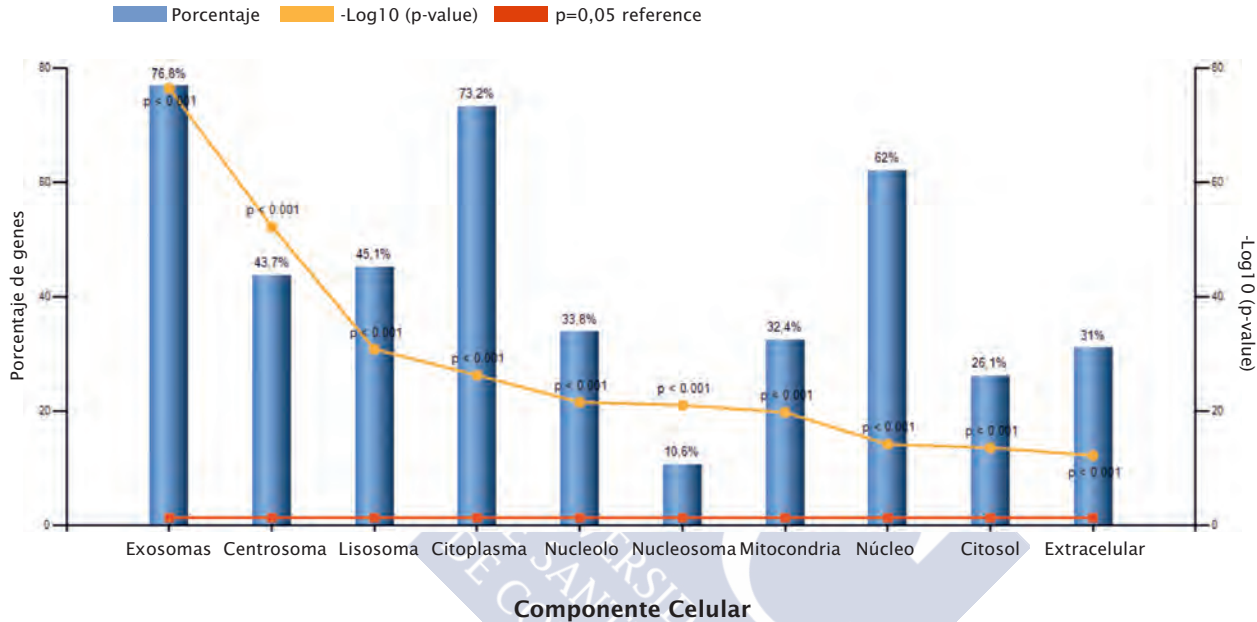


## 4. Resultados

### 4.1. El análisis proteómico de los secretomas de las células de melanoma uveal UM-A evidencia la presencia de un alto número de proteínas secretadas por la vía no convencional.

Se realizó una primera aproximación al estudio de nuevos mecanismos de comunicación tumoral mediante el análisis del secretoma de la línea celular UM-A previamente establecido y caracterizado por el grupo. En concreto, se realizó un marcaje de proteómica cuantitativa SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) para poder detectar las proteínas secretadas *de novo*; para ello, las células fueron cultivadas y marcadas con variantes isotópicas de lisina y arginina tal y cómo se describe en los métodos. Los secretomas de seis experimentos independientes fueron procesados y analizados por espectrometría de masas pudiendo así identificar 131 proteínas marcadas (Tabla 12). Tras un análisis mediante un software de predicción de la secreción basado en la secuencia aminoacídica (SecretomeP 2.0- *Centre for Biological Sequence Analysis*: <http://www.cbs.dtu.dk/services/secretomeP/>), se pudo clasificar las proteínas como no secretadas o secretadas, y dentro de este grupo, si la secreción se producía por la presencia de un péptido señal mediante la vía clásica de secreción, o por el contrario era debida a otro tipo de rutas de secreción denominadas no clásicas. De las 131 proteínas identificadas, 31 (24%) fueron clasificadas como secretadas por la vía clásica con péptido señal, 13 (10%) con secreción de tipo no clásica bien por translocación directa a través de la membrana plasmática, o bien mediante procesos que implican la formación de exosomas u otras microvesículas extracelulares,<sup>223</sup> y el resto, 87 (66%) como no secretadas. Al procesar la lista de proteínas presentes en el secretoma de UM-A mediante una herramienta de análisis funcional *online* de libre acceso (*Funrich*: <http://www.funrich.org/>), se pudo confirmar un elevado porcentaje de proteínas de origen exosomal y lisosomal, y también clasificadas como citoplasmáticas o del núcleo (Fig. 35).

## Componente celular de secretoma UM-A



**Figura 35. Componente celular de las proteínas identificadas en los secretomas de células UM-A. El gráfico muestra el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

Comparando los datos obtenidos con la literatura hemos encontrado muchas proteínas que se han descrito como comunes para los exosomas independientemente del origen de estas microvesículas.<sup>250</sup> Dentro del grupo de proteínas relacionadas con la adhesión celular se ha encontrado la *Thrombospondin-1* (THSB-1); en cuanto a las proteínas relacionadas con la estructura celular y motilidad se encuentran las actinas y la moesina. También se identifican proteínas chaperonas y *Heat shock* como HSPA8 y SP90AB1; enzimas metabólicas como la  $\alpha$ -Enolasa, GADPH y PGK1; proteínas relacionadas con la

síntesis y transcripción como diferentes tipos de histonas, EF2 y EF1β; y proteínas implicadas en endocitosis y fusión de membranas como CLTC y GDI2.

Llama especialmente la atención al analizar las proteínas detectadas la presencia de antígenos ya conocidos de melanoma como MIA (*Melanoma-derived growth regulatory protein*) y pMEL17 (*Melanocyte protein PMEL*).

SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
P02649	APOE_HUMAN	<i>Apolipoprotein E</i>	13,06	PS
P01033	TIMP1_HUMAN	<i>Metalloproteinase inhibitor 1</i>	11,75	PS
Q08380	LG3BP_HUMAN	<i>Galectin-3-binding protein</i>	11,51	PS
Q16769	QPCT_HUMAN	<i>Glutaminyl-peptide cyclotransferase</i>	11,15	PS
P02751	FINC_HUMAN	<i>Fibronectin</i>	9,84	PS
Q96KN2	CNDP1_HUMAN	<i>Beta-Ala-His dipeptidase</i>	9,59	PS
Q99988	GDF15_HUMAN	<i>Growth/differentiation factor 15</i>	9,46	PS
P07996	TSP1_HUMAN	<i>Thrombospondin-1</i>	8,64	PS
Q16610	ECM1_HUMAN	<i>Extracellular matrix protein 1</i>	8,46	PS
P07602	SAP_HUMAN	<i>Prosaposin</i>	8,10	PS
Q969P0	IGSF8_HUMAN	<i>Immunoglobulin superfamily member 8</i>	7,24	PS
P09486	SPRC_HUMAN	<i>SPARC</i>	7,20	PS
P16070	CD44_HUMAN	<i>CD44 antigen</i>	6,60	PS
P07093	GDN_HUMAN	<i>Glia-derived nexin</i>	6,49	PS
P25391	LAMA1_HUMAN	<i>Laminin subunit alpha-1</i>	6,48	PS
P01034	CYTC_HUMAN	<i>Cystatin-C</i>	6,20	PS



SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
P26583	HMGB2_HUMAN	<i>High mobility group protein B2</i>	5,96	0,26
O60462	NRP2_HUMAN	<i>Neuropilin-2</i>	5,87	PS
P61769	B2MG_HUMAN	<i>Beta-2-microglobulin</i>	5,72	PS
P11216	PYGB_HUMAN	<i>Glycogen phosphorylase, brain form</i>	5,24	0,42
P54819	KAD2_HUMAN	<i>Adenylate kinase 2, mitochondrial</i>	5,17	0,44
P40926	MDHM_HUMAN	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	4,95	0,66
P27695	APEX1_HUMAN	<i>DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase</i>	4,91	0,66
P11142	HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	4,49	0,22
P34932	HSP74_HUMAN	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	4,43	0,23
P22392	NDKB_HUMAN	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>	4,32	0,33
Q9ULV4	COR1C_HUMAN	<i>Coronin-1C</i>	4,30	0,58
P50395	GDIB_HUMAN	<i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>	4,28	0,32
P04075	ALDOA_HUMAN	<i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>	4,19	0,36
P13639	EF2_HUMAN	<i>Elongation factor 2</i>	4,14	0,38
O43175	SERA_HUMAN	<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase</i>	4,11	0,48
O43707	ACTN4_HUMAN	<i>Alpha-actinin-4</i>	4,04	0,44
P04406	G3P_HUMAN	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	4,00	0,47
P26038	MOES_HUMAN	<i>Moesin</i>	3,97	0,53
P40967	PMEL17_HUMAN	<i>Melanocyte protein Pmel 17</i>	3,96	PS
P00558	PGK1_HUMAN	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	3,86	0,39
P78417	GSTO1_HUMAN	<i>Glutathione S-transferase omega-1</i>	3,85	0,44
P23381	SYWC_HUMAN	<i>Tryptophanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic</i>	3,83	0,40
P14618	KPYM_HUMAN	<i>Pyruvate kinase isozymes M1/M2</i>	3,83	0,42

SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
Q00610	CLH1_HUMAN	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	3,72	0,44
P22314	UBA1_HUMAN	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	3,69	0,53
P13796	PLSL_HUMAN	<i>Plastin-2</i>	3,68	0,50
P09211	GSTP1_HUMAN	<i>Glutathione S-transferase P</i>	3,60	0,55
P26641	EF1G_HUMAN	<i>Elongation factor 1-gamma</i>	3,59	0,35
P29401	TKT_HUMAN	<i>Transketolase</i>	3,54	0,32
Q9P258	RCC2_HUMAN	<i>Protein RCC2</i>	3,48	0,34
Q92688	AN32B_HUMAN	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B</i>	3,39	0,07
P07225	PROS_HUMAN	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	3,38	PS
P22234	PUR6_HUMAN	<i>Multifunctional protein ADE2</i>	3,30	0,50
P07195	LDHB_HUMAN	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	3,28	0,57
P41250	SYG_HUMAN	<i>Glycyl-tRNA synthetase</i>	3,26	PS
P30041	PRDX6_HUMAN	<i>Peroxiredoxin-6</i>	3,24	0,38
P17931	LEG3_HUMAN	<i>Galectin-3</i>	3,20	0,77
P62937	PPIA_HUMAN	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>	3,17	0,34
P12814	ACTN1_HUMAN	<i>Alpha-actinin-1</i>	3,16	0,43
P08253	MMP2_HUMAN	<i>72 kDa type IV collagenase</i>	3,15	PS
P06733	ENOA_HUMAN	<i>Alpha-enolase</i>	3,15	0,54
P14174	MIF_HUMAN	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>	3,14	0,78
P23526	SAHH_HUMAN	<i>Adenosylhomocysteinase</i>	3,12	0,51
P30086	PEBP1_HUMAN	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	3,10	0,67
Q06830	PRDX1_HUMAN	<i>Peroxiredoxin-1</i>	3,08	0,55

SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
P00338	LDHA_HUMAN	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	3,03	0,55
P49721	PSB2_HUMAN	<i>Proteasome subunit beta type-2</i>	3,02	0,40
P04179	SODM_HUMAN	<i>Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial</i>	3,02	0,54
P60174	TPIS_HUMAN	<i>Triosephosphate isomerase</i>	3,01	0,51
Q16270	IBP7_HUMAN	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 7</i>	2,96	PS
Q9Y617	SERC_HUMAN	<i>Phosphoserine aminotransferase</i>	2,95	0,38
P62258	1433E_HUMAN	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	2,90	0,33
P22626	ROA2_HUMAN	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	2,90	0,08
P63104	1433Z_HUMAN	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>	2,89	0,25
P07900	HS90A_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	2,83	0,17
P63261	ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic</i>	2,83	0,51
P08670	VIME_HUMAN	<i>Vimentin</i>	2,82	0,51
P62805	H4_HUMAN	<i>Histone H4</i>	2,82	0,41
Q99729-4	ROAA_HUMAN	<i>Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B</i>	2,79	0,15
O14979	HNRDL_HUMAN	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like</i>	2,78	0,22
P06748	NPM_HUMAN	<i>Nucleophosmin</i>	2,72	0,81
Q99878	H2A1J_HUMAN	<i>Histone H2A type 1-J</i>	2,71	0,56
B2RPK0	HGB1A_HUMAN	<i>Putative high mobility group protein B1-like 1</i>	2,68	0,05
P26639	SYTC_HUMAN	<i>Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic</i>	2,65	0,34
P24821	TENA_HUMAN	<i>Tenascin</i>	2,62	PS
O75874	IDHC_HUMAN	<i>Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic</i>	2,61	0,55

SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
O00410	IPO5_HUMAN	<i>Importin-5</i>	2,60	0,63
O00391	QSOX1_HUMAN	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	2,59	PS
P62318	SMD3_HUMAN	<i>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3</i>	2,59	0,76
P07910	HNRPC_HUMAN	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2</i>	2,58	0,30
P61604	CH10_HUMAN	<i>10 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	2,50	0,57
P09651	ROA1_HUMAN	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	2,48	0,11
P17174	AATC_HUMAN	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	2,42	0,44
Q9NZM1	MYOF_HUMAN	<i>Myoferlin</i>	2,37	0,35
P08238	HS90B_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	2,36	0,20
Q99880	2B1L_HUMAN	<i>Histone H2B type 1-L</i>	2,32	0,32
P00491	PNPH_HUMAN	<i>Purine nucleoside phosphorylase</i>	2,24	0,51
Q8IUE6	H2A2B_HUMAN	<i>Histone H2A type 2-B</i>	2,22	0,52
P19338	NUCL_HUMAN	<i>Nucleolin</i>	2,22	0,39
P05455	LA_HUMAN	<i>Lupus La protein</i>	2,19	0,27
P16035	TIMP2_HUMAN	<i>Metalloproteinase inhibitor 2</i>	2,19	PS
P40925	MDHC_HUMAN	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	2,14	0,46
Q96QV6	H2A1A_HUMAN	<i>Histone H2A type 1-A</i>	2,14	0,52
P30046	DOPD_HUMAN	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>	2,01	0,48
P05386	RLA1_HUMAN	<i>60S acidic ribosomal protein P1</i>	2,00	0,41
P07737	PROF1_HUMAN	<i>Profilin-1</i>	2,00	0,47
O43776	SYNC_HUMAN	<i>Asparaginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic</i>	1,97	0,41
Q9BTM1	H2AJ_HUMAN	<i>Histone H2A.J</i>	1,94	0,60

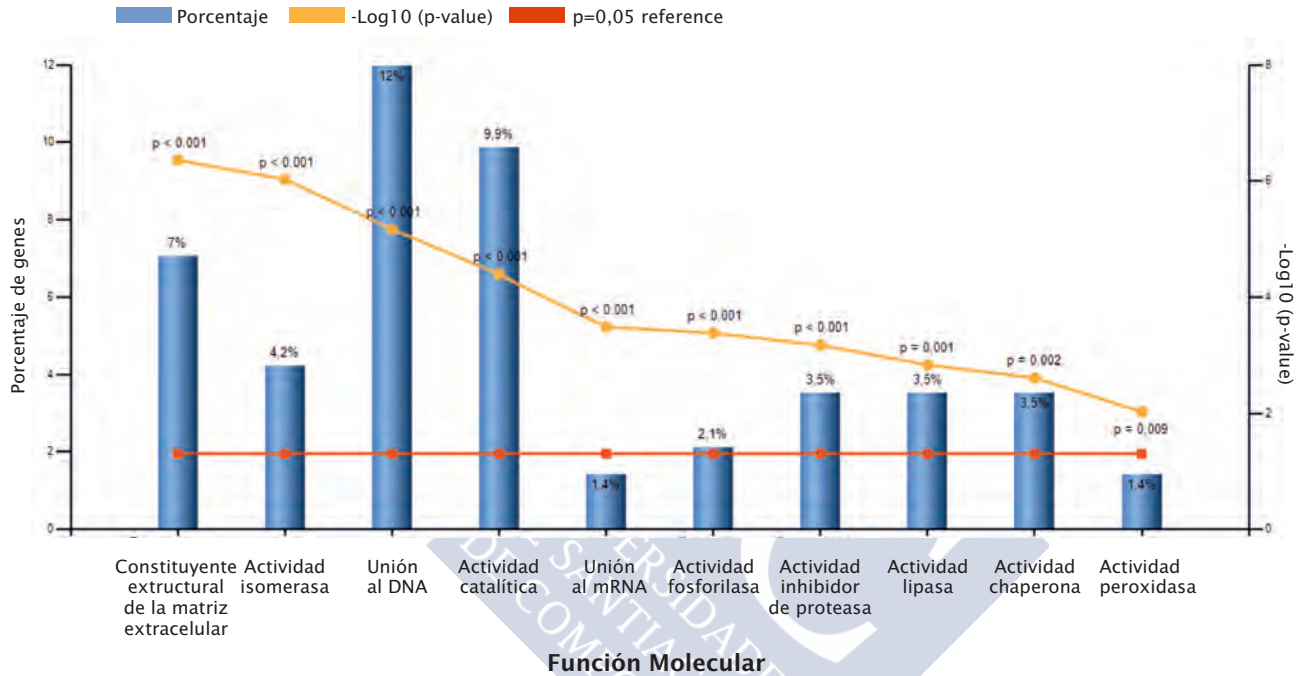
SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
Q8N0Y7	PGAM4_HUMAN	<i>Probable phosphoglycerate mutase 4</i>	1,90	0,37
P61981	1433G_HUMAN	<i>14-3-3 protein gamma</i>	1,85	0,29
P23528	COF1_HUMAN	<i>Cofilin-1</i>	1,76	0,63
O00625	PIR_HUMAN	<i>Pirin</i>	1,72	0,49
P37802	TAGL2_HUMAN	<i>Transgelin-2</i>	1,72	0,78
P38646	GRP75_HUMAN	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	1,66	0,28
P06737	PYGL_HUMAN	<i>Glycogen phosphorylase, liver form</i>	1,64	0,38
P02786	TFR1_HUMAN	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	1,57	0,61
Q15691	MARE1_HUMAN	<i>Microtubule-associated protein RP/EB family member 1</i>	1,55	0,36
Q14103-4	HNRPD_HUMAN	<i>Isoform p37 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0</i>	1,51	0,11
P15259	PGAM2_HUMAN	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	1,43	0,58
Q16674	MIA_HUMAN	<i>Melanoma-derived growth regulatory protein</i>	1,39	PS
P11047	LAMC1_HUMAN	<i>Laminin subunit gamma-1</i>	1,30	PS
Q02790	FKBP4_HUMAN	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP4</i>	1,29	0,29
P27348	1433T_HUMAN	<i>14-3-3 protein theta</i>	1,22	0,26
Q15019	SEPT2_HUMAN	<i>Septin-2</i>	1,18	0,13
Q01105	SET_HUMAN	<i>Protein SET</i>	1,13	0,16
P31946	1433B_HUMAN	<i>14-3-3 protein beta/alpha</i>	1,09	0,35
P06744	G6PI_HUMAN	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	1,02	0,45
Q08945	SSRP1_HUMAN	<i>FACT complex subunit SSRP1</i>	0,91	0,10
Q13418	ILK_HUMAN	<i>Integrin-linked protein kinase</i>	0,57	0,38

SECRETOMA DE UMA-MARCAJE SILAC				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
P01008	ANT3_HUMAN	<i>Antithrombin-III</i>	0,55	PS
Q99873	ANM1_HUMAN	<i>Protein arginine N-methyltransferase 1</i>	0,37	0,38
Q16881-2	TRXR1_HUMAN	<i>Isoform TXNRD1_v4 of Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic</i>	0,33	0,36
P02647	APOA1_HUMAN	<i>Apolipoprotein A-I</i>	0,14	PS
P07942	LAMB1_HUMAN	<i>Laminin subunit beta-1</i>	0,13	PS
Q9UIJ7	KAD3_HUMAN	<i>GTP:AMP phosphotransferase mitochondrial</i>	0,05	0,63

Tabla 12. Proteínas identificadas en los secretomas tras marcaje SILAC de las células UM-A. Se muestra la lista de proteínas identificadas por espectrometría de masas de los secretomas de 48 horas de células UM-A. Las proteínas marcadas se ordenan de mayor a menor ratio de marcaje (H: L). Se muestra el código de acceso al *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>), la identificación de la proteína, el nombre, el ratio de marcaje *H: Heavy* lisina [L-[<sup>13</sup>C6]-Lys] y arginina [L-[<sup>13</sup>C6,<sup>15</sup>N4]-Arg] frente a *L: Light*-peptidos sin marcar lisina [L-[<sup>12</sup>C6]-Lys] y arginina [L-[<sup>12</sup>C6,<sup>14</sup>N4]-Arg], y la puntuación del Secretome P para la predicción de proteínas secretadas por la vía clásica con péptido señal (PS); las proteínas no secretadas clásicamente deben obtener un NN-score superior al umbral de 0,6.

La clasificación de las proteínas secretadas en UM-A en cuanto a su función molecular muestra la presencia de proteínas de unión al ADN y con actividad catalítica, seguida por las proteínas que constituyen la estructura de la matriz extracelular (Fig. 36).

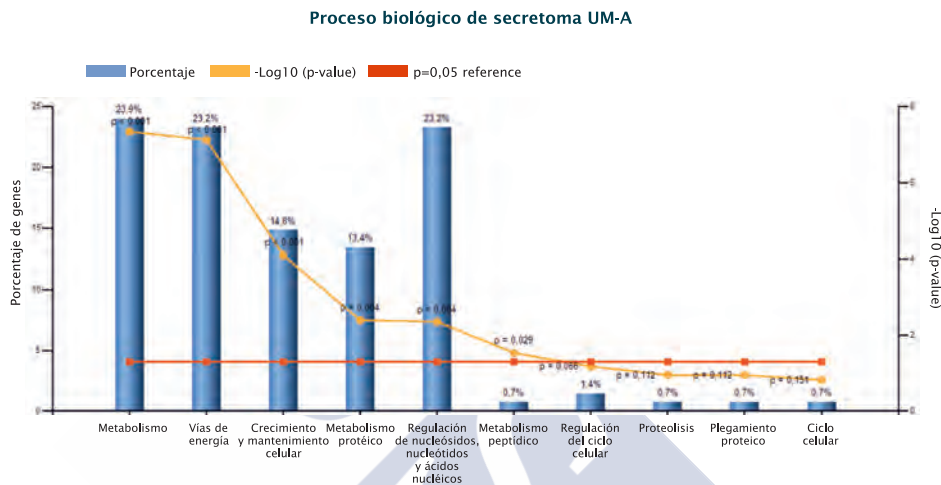
## Función molecular del secretoma UM-A



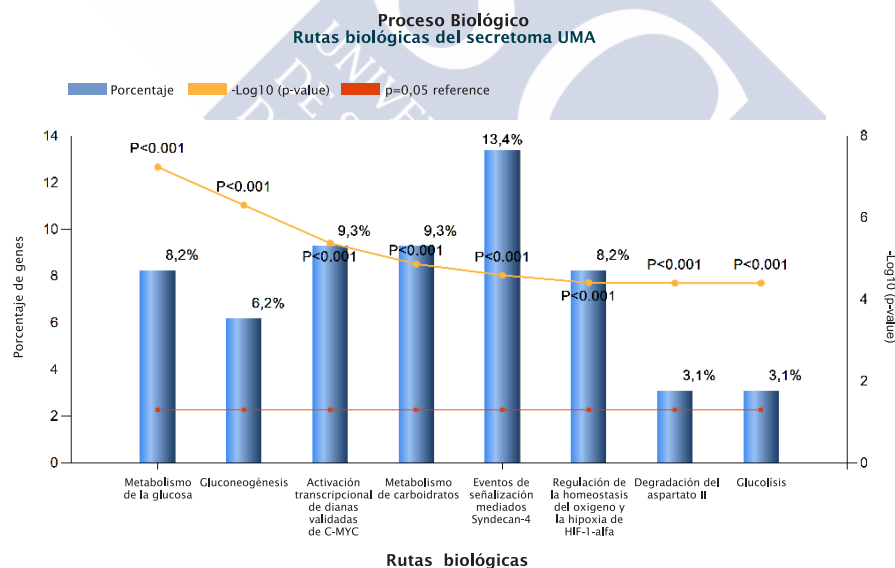
**Figura 36.** Clasificación en cuanto a la función molecular de las proteínas identificadas en los secretomas de células UM-A. El gráfico muestra histogramas del porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.

En cuanto al proceso biológico, cabe destacar las proteínas relacionadas con el metabolismo celular, rutas energéticas, y sobre todo las implicadas en el crecimiento o mantenimiento celular o regulación del ciclo celular (Fig. 37A); y en relación a la ruta biológica, cabe destacar la vía de señalización mediada por *Syndecan* (Fig. 37B).

A



B



**Figura 37. Clasificación en cuanto al proceso biológico y la ruta biológica de las proteínas identificadas en los secretomas de células UM-A (A, B). El gráfico muestra histogramas del porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**



## 4.2. Las líneas celulares de melanoma uveal secretan microvesículas de tipo exosomal al medio de cultivo.

Teniendo en cuenta los resultados del análisis del secretoma de UM-A, donde se evidencia un alto porcentaje de proteínas secretadas por la vía no clásica, y en concreto clasificadas como pertenecientes a exosomas, se puso a punto un protocolo para el aislamiento de microvesículas extracelulares en el secretoma de las líneas celulares de melanoma uveal UM-A, OMM1 y OMM2.5 siguiendo las directrices de otros trabajos previos en la bibliografía tal y como se describe en la sección de métodos.<sup>236,251</sup> Al igual que en el estudio del secretoma, se usaron técnicas de proteómica cuantitativa SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*) y CILAIR (*Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates*) con el objetivo de marcar las microvesículas para su análisis; para ello, las células de melanoma uveal fueron cultivadas y marcadas con variantes isotópicas de lisina y arginina tal y cómo se describe en los métodos.

Una vez aisladas, las microvesículas fueron caracterizadas mediante dispersión de luz, microscopía electrónica e inmunodetección de proteínas específicas. Así, se pudo comprobar, que las células de melanoma uveal en cultivo liberan vesículas de un diámetro compatible con vesículas de tipo exosomal (50-100nm) (Fig. 38 B). Se confirmó la naturaleza exosomal de las partículas aisladas mediante inmunodetección de las proteínas exosomales CD9 (24 kDa) y CD63 (24 kDa) (Fig. 38C) confirmando los resultados anteriores.

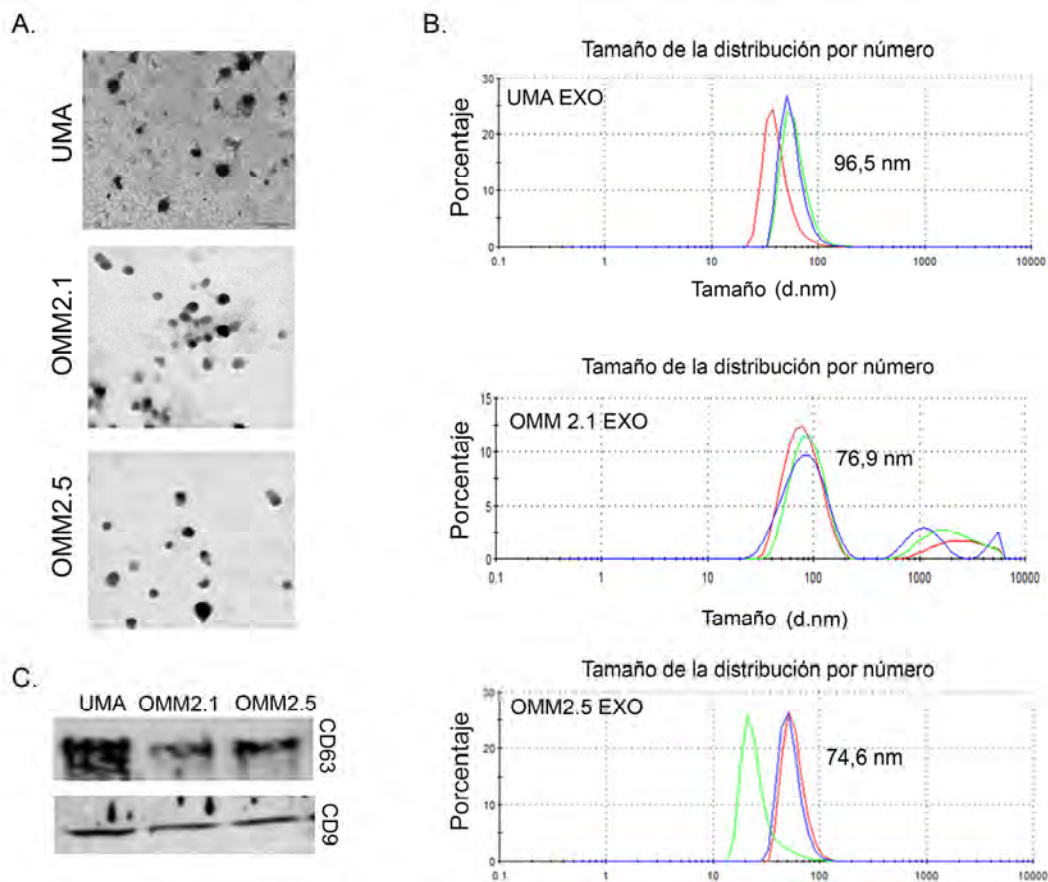


Figura 38. Caracterización de microvesículas liberadas por células de melanoma uveal en cultivo. A. Se muestra la caracterización mediante microscopía electrónica; B. Dispersión de luz (Zetasizer) e C. Inmunodetección de marcadores exosomales CD63 y CD9.

### 4.3. Análisis del proteoma de los exosomas secretados por las células UM-A

Se realizó la identificación proteómica de los componentes exosomales tras el marcaje CILAIR del cultivo UM-A. En total en el pellet exosomal se identificaron 38 proteínas mediante espectrometría de masas; de la cuales 17 (45%) presentaron marcaje isotópico. Las proteínas identificadas marcadas ordenadas de mayor a menor ratio de marcaje (*H:L*), y las no marcadas, se muestran en la Tabla 13. La puntuación obtenida en el servidor *Secretome P* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) para la clasificación de las proteínas identificadas como potencialmente secretadas se muestra al lado de cada proteína. De las 38 proteínas identificadas, 12 (32%) presentaban péptido señal, 2 (5%) se clasificaron como de vía no-clásica; y 24 (63%) como no secretadas.

EXOSOMAS DE UMA-MARCAJE CILAIR				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
Q00610	CLH1_HUMAN	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	26,9	0,54
P08195	4F2_HUMAN	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	17,5	0,64
P11142	HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	9,2	0,23
Q15758	AAAT_HUMAN	<i>Neutral amino acid transporter B(0)</i>	9,2	0,73
Q08380	LG3BP_HUMAN	<i>Galectin-3-binding protein</i>	8,8	PS
O15240	VGf_HUMAN	<i>Neurosecretory protein VGF</i>	8,7	PS
P02751	FINC_HUMAN	<i>Fibronectin</i>	8,4	PS
O00391	QSOX1_HUMAN	<i>Sulphydryl oxidase 1</i>	7,9	PS
P07996	TSP1_HUMAN	<i>Thrombospondin-1</i>	7,7	PS
P26038	MOES_HUMAN	<i>Moesin</i>	7,6	0,53

EXOSOMAS DE UMA-MARCAJE CILAIR				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
P07942	LAMB1_HUMAN	<i>Laminin subunit beta-1</i>	7,3	PS
O43707	ACTN4_HUMAN	<i>Alpha-actinin-4</i>	6,9	0,42
P63261	ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	6,8	0,51
P07900	HS90A_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	5,3	0,17
Q9BOE3	TBA1C_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	5,2	0,46
P68363	TBA1B_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	5,2	0,52
P08238	HS90B_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	1,9	0,20
P02768	ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>		PS
P07093	GDN_HUMAN	<i>Glia-derived nexin</i>		PS
P04264	K2C1_HUMAN	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>		0,10
P13645	K1C10_HUMAN	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>		0,12
P35908	K22E_HUMAN	<i>Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal</i>		0,13
P07437	TBB5_HUMAN	<i>Tubulin beta chain</i>		0,53
P22314	UBA1_HUMAN	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>		0,53
P05023	AT1A1_HUMAN	<i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1</i>		0,59
P02042	HBD_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit delta</i>		0,48
P38646	GRP75_HUMAN	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>		0,28
Q08431	MFGM_HUMAN	<i>Lactadherin</i>		PS
P41250	SYG_HUMAN	<i>Glycine--tRNA ligase</i>		0,48
P00750	TPA_HUMAN	<i>Tissue-type plasminogen activator</i>		PS
P16070	CD44_HUMAN	<i>CD44 antigen</i>		PS
P08572	CO4A2_HUMAN	<i>Collagen alpha-2(IV) chain</i>		0,07
Q9Y4L1	HYOU1_HUMAN	<i>Hypoxia up-regulated protein 1</i>		0,52

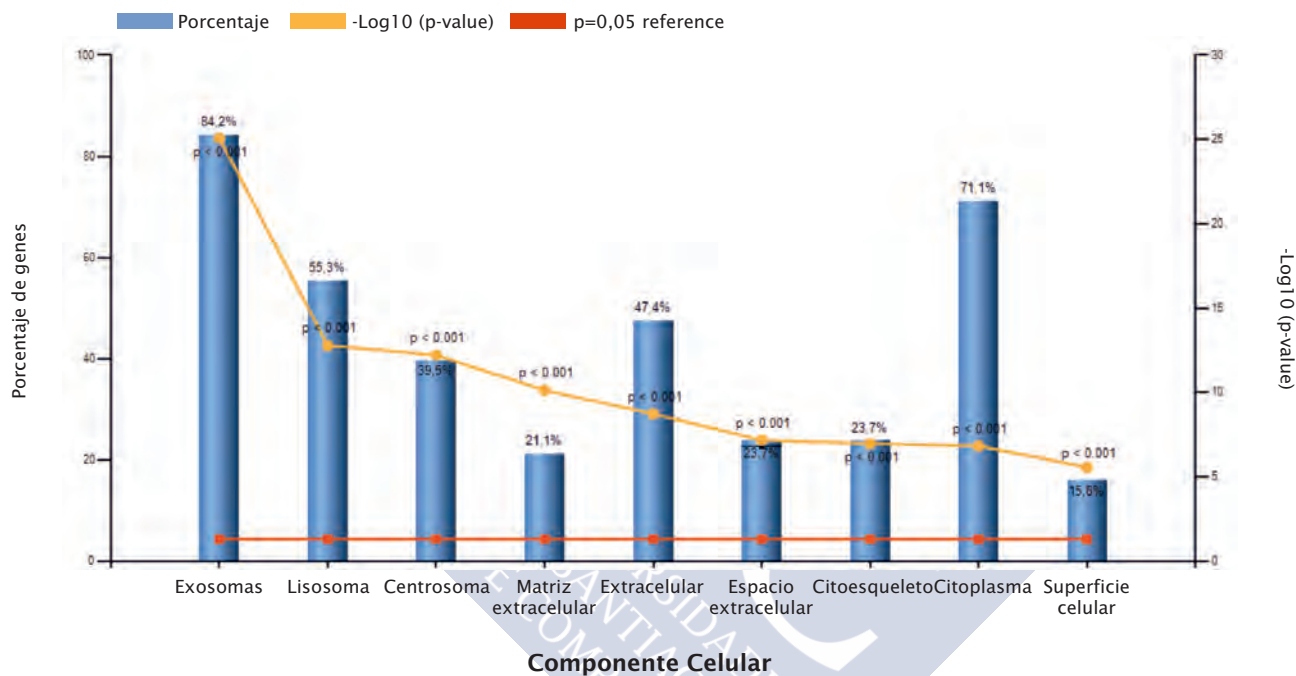
EXOSOMAS DE UMA-MARCAJE CILAIR				
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	ID PROTEÍNA	NOMBRE	H:L	SecretomeP
P14618	KPYM_HUMAN	<i>Pyruvate kinase PKM</i>		0,43
P13929	ENOB_HUMAN	<i>Enolase</i>		0,28
Q03169	TNAP2_HUMAN	<i>Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2</i>		0,24
Q7KZF4	SND1_HUMAN	<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>		0,30
Q8N144	CXD3_HUMAN	<i>Gap junction delta-3 protein</i>		PS

Tabla 13. Proteínas identificadas en los exosomas tras el marcaje CILAIR de las células UM-A. Se muestra la lista de proteínas identificadas por espectrometría de masas tras el aislamiento de exosomas en los secretomas de células UM-A de 48 horas sin suero. Las proteínas marcadas se ordenan de mayor a menor ratio de marcaje (H: L), y a continuación se enumeran las proteínas identificadas que no presentaron marcaje. Se muestra el código de acceso al *Uniprot* (<http://www.uniprot.org/>), la identificación de la proteína, el nombre, el ratio de marcaje *H: Heavy* lisina [L-[<sup>13</sup>C6]-Lys] y arginina [L-[<sup>13</sup>C6,<sup>15</sup>N4]-Arg] frente a *L: Light*-peptidos sin marcar, y la puntuación del Secretome P par la predicción de proteínas secretadas por la vía clásica con péptido señal (PS); las proteínas no secretadas clásicamente deben obtener un NN-score superior al umbral de 0,6.

4.4. Análisis funcional de las proteínas identificadas en exosomas UM-A

La lista de proteínas identificadas en los exosomas secretados por UM-A fueron procesadas al igual que en el caso del secretoma mediante la herramienta *on line* Funrich (*Funrich*: <http://www.funrich.org/>). En cuanto a la clasificación del componente celular, cabe destacar el alto porcentaje de proteínas clasificadas como exosomales, extracelulares, de matriz extracelular o espacio extracelular, así como procedentes del citoplasma y en menor medida de lisosomas, centrosoma y superficie celular (Figura 39).

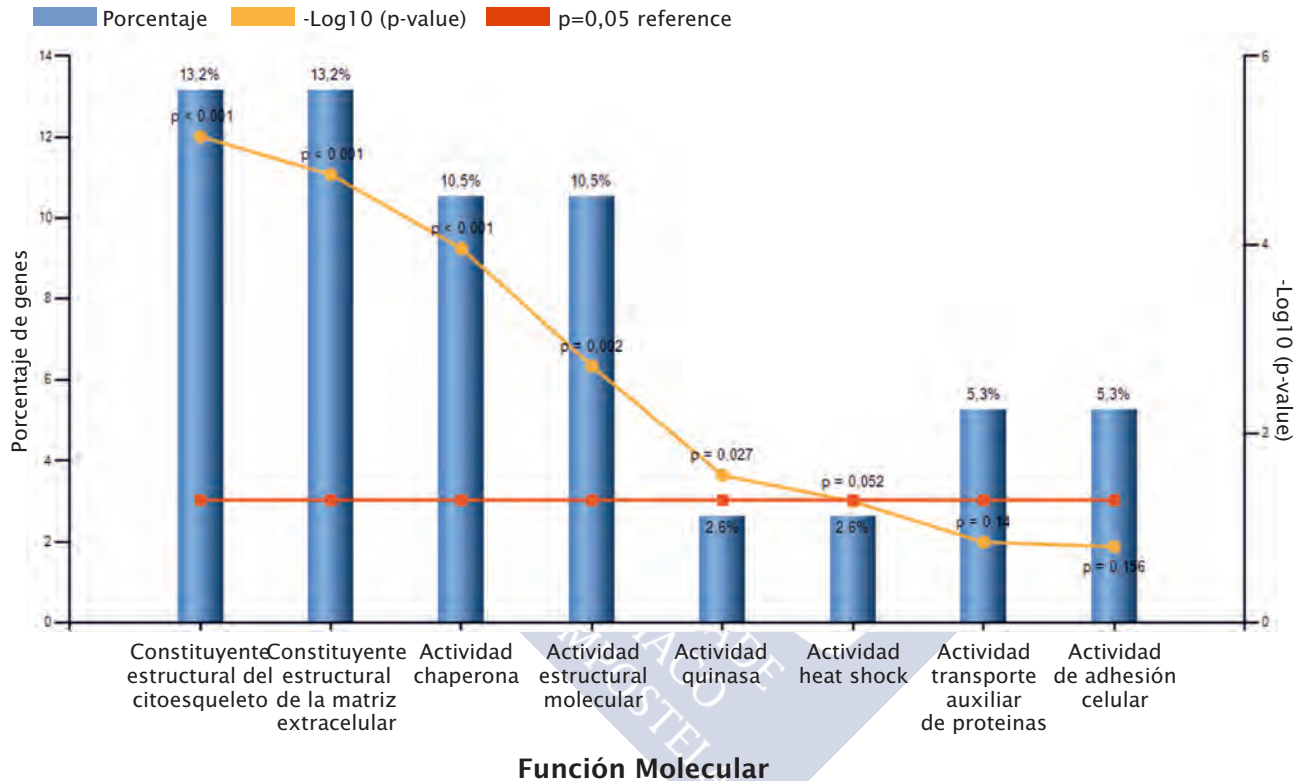
### Componente celular de exosoma UM-A



**Figura 39. Componente celular de las proteínas identificadas en los exosomas secretados por UM-A. El gráfico muestra el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

En cuanto a la función molecular, se encontró un alto porcentaje de proteínas estructurales constituyentes del citoesqueleto, de la matriz extracelular, con actividad chaperona o con actividad de molécula estructural, y en menor medida relacionadas con la adhesión celular (Fig. 40).

## Función molecular de exosoma UM-A



**Figura 40. Función molecular de las proteínas identificadas en los exosomas secretados por UM-A. Los histogramas muestran el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

Es interesante destacar la clasificación de las proteínas exosomales de UM-A en cuanto al proceso biológico, donde se encontró un gran porcentaje de proteínas implicadas en el crecimiento y/o mantenimiento celular; además se identifican proteínas relacionadas con

el metabolismo de proteínas, el transporte, la regulación del ciclo celular, respuesta al sistema inmune o comunicación celular entre otras (Fig. 41).

Proceso biológico de exosoma UM-A

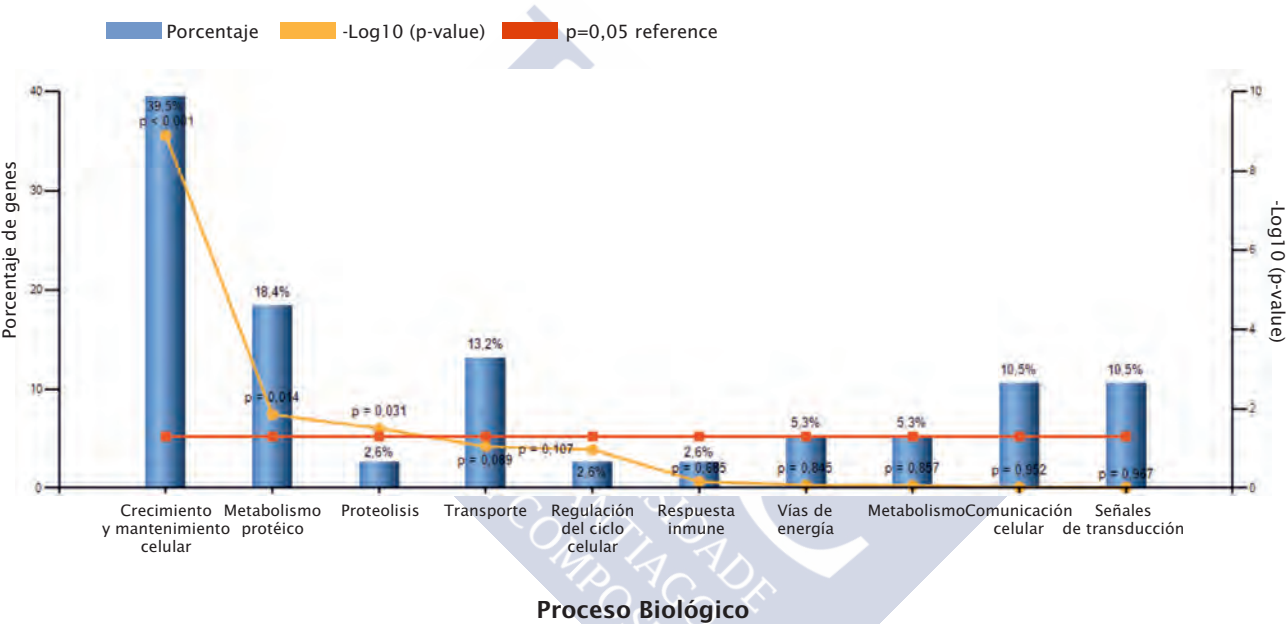
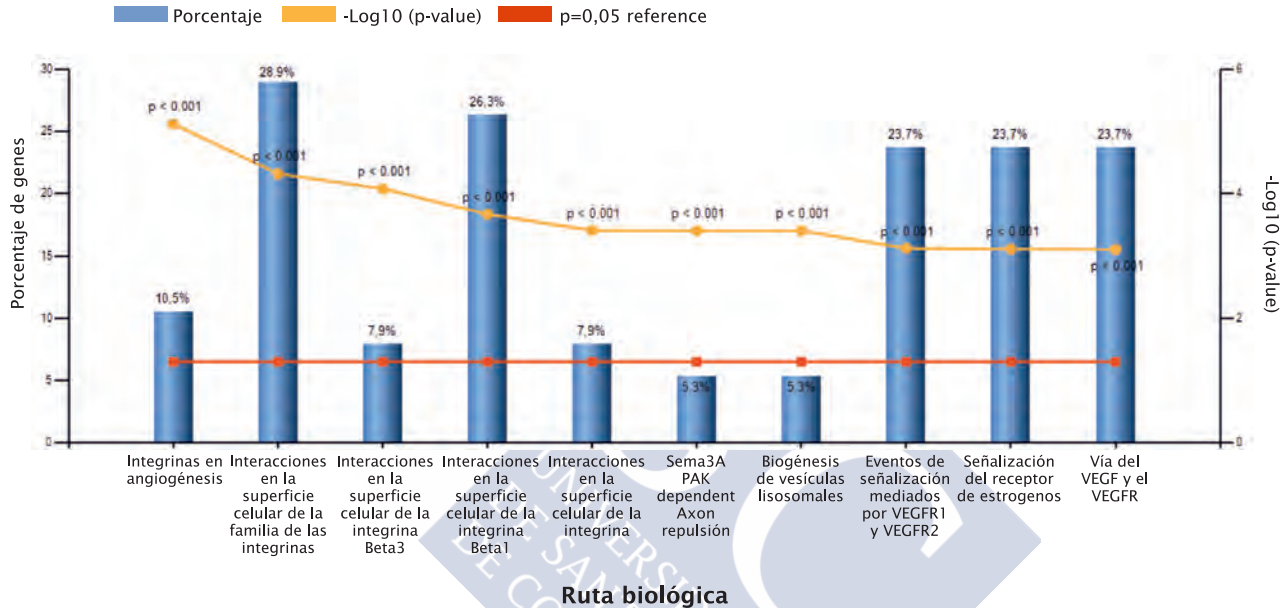


Figura 41. Proceso biológico en el que participan las proteínas identificadas en los exosomas secretados por UM-A. Los histogramas muestran el porcentaje de genes frente a la base de datos Funrich y p valor.

Por otro lado, el análisis de las rutas biológicas destaca la identificación de proteínas de la familia de las integrinas implicadas en la interacción de la superficie celular y de la angiogénesis; además aparecen proteínas relacionadas con señalización a través de VEGF y sus receptores (Fig. 42)



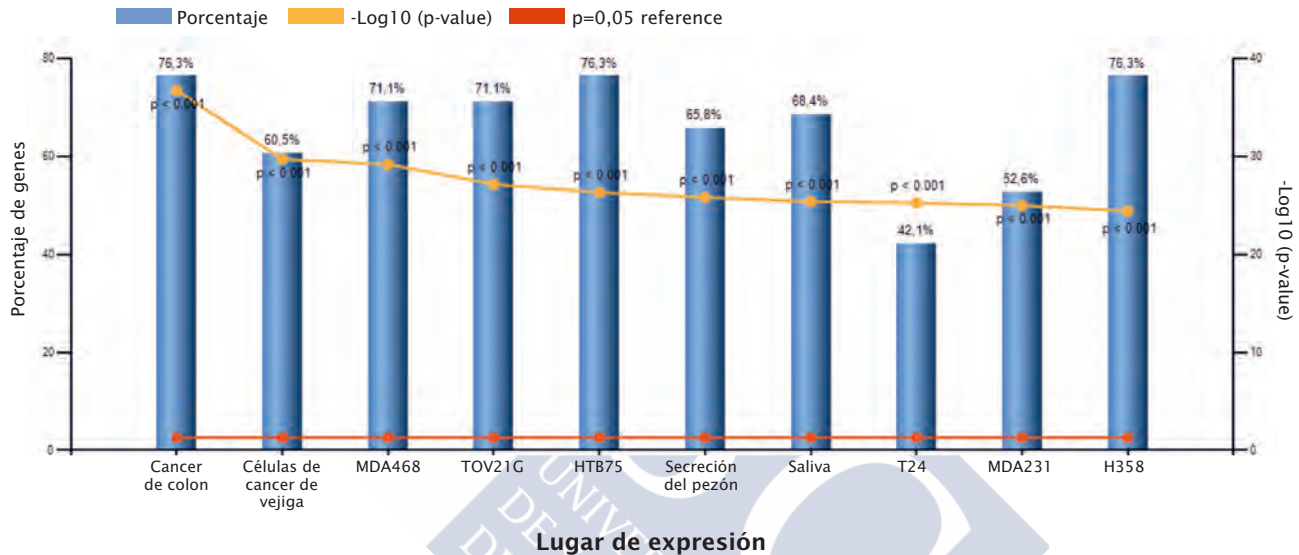
## Ruta biológica de exosomas UM-A



**Figura 42. Ruta biológica en la que participan las proteínas identificadas en los exosomas secretados por UM-A. Los histogramas muestran el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

Finalmente, al clasificar las proteínas exosomales de UM-A en cuanto al lugar de expresión, encontramos un alto porcentaje de proteínas previamente identificadas en células de cáncer colorectal, de vejiga (T24), de mama (MDA468), adenocarcinoma de ovario (TOV21G, HTB75) o pulmón (H358) (Fig. 43).

### Lugar de expresión exosomas UM-A



**Figura 43. Clasificación por lugar de expresión de las proteínas identificadas en los exosomas secretados por UM-A. Los histogramas muestran el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

### 4.5. Comparativa secretomas UM-A vs Exosomas UM-A

A pesar de las diferentes aproximaciones metodológicas empleadas, SILAC y CILAIR, se planteó un análisis diferencial entre las proteínas identificadas en los secretomas y los exosomas de la misma línea celular ya que los secretomas analizados no habían sido deplecionados de vesículas para su estudio. Al realizar la comparativa entre las proteínas detectadas en secretomas y exosomas se encontraron 18 proteínas en común (Tabla Anexo II), 113 exclusivas del secretoma, y 20 proteínas sólo presentes en los exosomas aislados (Tabla Anexo II) (Fig. 44). La identificación de 20 proteínas nuevas en el análisis de exosomas confirma el enriquecimiento de la muestra al aislar los exosomas.

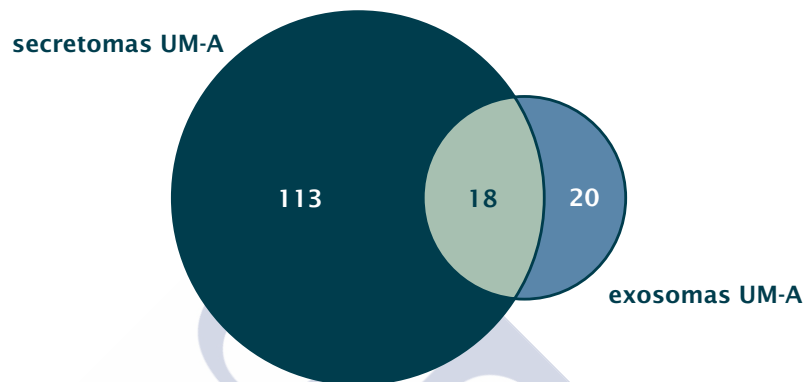


Figura 44. Diagrama de Venn mostrando las proteínas identificadas en el secretoma y los exosomas de UM-A.

#### 4.6. El análisis del proteoma de exosomas liberados por células de melanoma uveal metastásico muestra diferencias en función del lugar de metástasis.

Además del análisis del proteoma de los exosomas del cultivo primario de melanoma uveal UM-A, se puso a punto un análisis cuantitativo SILAC con el objetivo de comparar dos líneas celulares de melanoma uveal metastásico procedentes del mismo tumor primario: OMM1 obtenido de una metástasis cutánea, y OMM2.5 de una metástasis hepática. Tras el marcaje y análisis por espectrometría de masas se pudo observar que el proteoma de los exosomas variaba en función de la línea celular de origen y por lo tanto del lugar de metástasis (Tabla 14). En concreto, en el estudio comparativo se encontraron 29 proteínas elevadas en los exosomas de la metástasis cutánea [10 (3%) con péptido señal; 2 (7%) vía no clásica; 17 (59%) no secretadas], y 8 en la hepática [7 con péptido señal; 1 no secretada]; 16 proteínas identificadas no presentaron marcaje [7 (44%) con péptido señal, y 9 (56%) no secretadas (Fig. 45; Tabla 14).

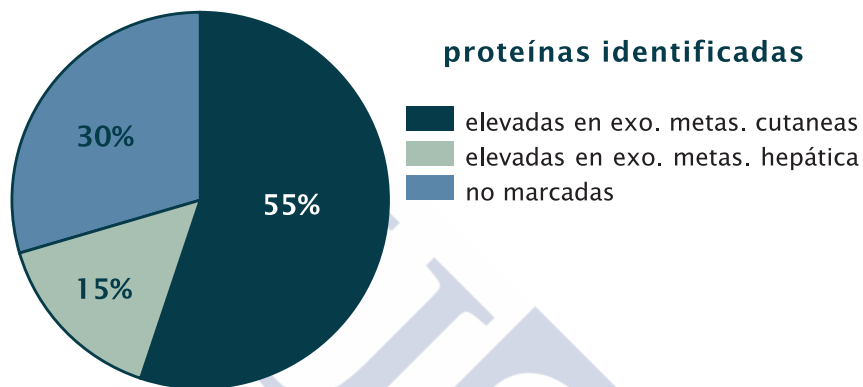


Figura 45. Proteínas identificadas en el análisis SILAC comparando los exosomas de una metástasis cutánea y hepática de un mismo tumor primario de melanoma uveal. Se muestra un diagrama de Venn con el porcentaje de proteínas elevadas tras el marcaje cuantitativo y las identificadas que no presentaron marcaje.

CÓDIGO ACCESO UNIPROT	NOMBRE	H:L	SecretomeP
<b>PROTEÍNAS ELEVADAS EN EXOSOMAS DE LÍNEA METASTÁTICA HEPÁTICA (OMM2.5)</b>			
PLOD3_HUMAN	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3</i>	3,8	PS
ECM1_HUMAN	<i>Extracellular matrix protein 1</i>	1,9	PS
PROS_HUMAN	<i>Vitamin K-dependent protein S</i>	1,3	PS
PLOD1_HUMAN	<i>Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1</i>	1,5	PS
EZRI_HUMAN	<i>Ezrin</i>	1,1	0.567
FINC_HUMAN	<i>Fibronectin</i>	1,4	PS
MATN2_HUMAN	<i>Matrilin-2</i>	2,2	PS
CSTN1_HUMAN	<i>Calsyntenin-1</i>	2,1	PS
<b>PROTEÍNAS ELEVADAS EN EXOSOMAS EN LA LÍNEA METASTÁTICA CUTÁNEA (OMM2.1)</b>			
LG3BP_HUMAN	<i>Galectin-3-binding protein</i>	0,1	PS
G3P_HUMAN	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	0,2	0.467

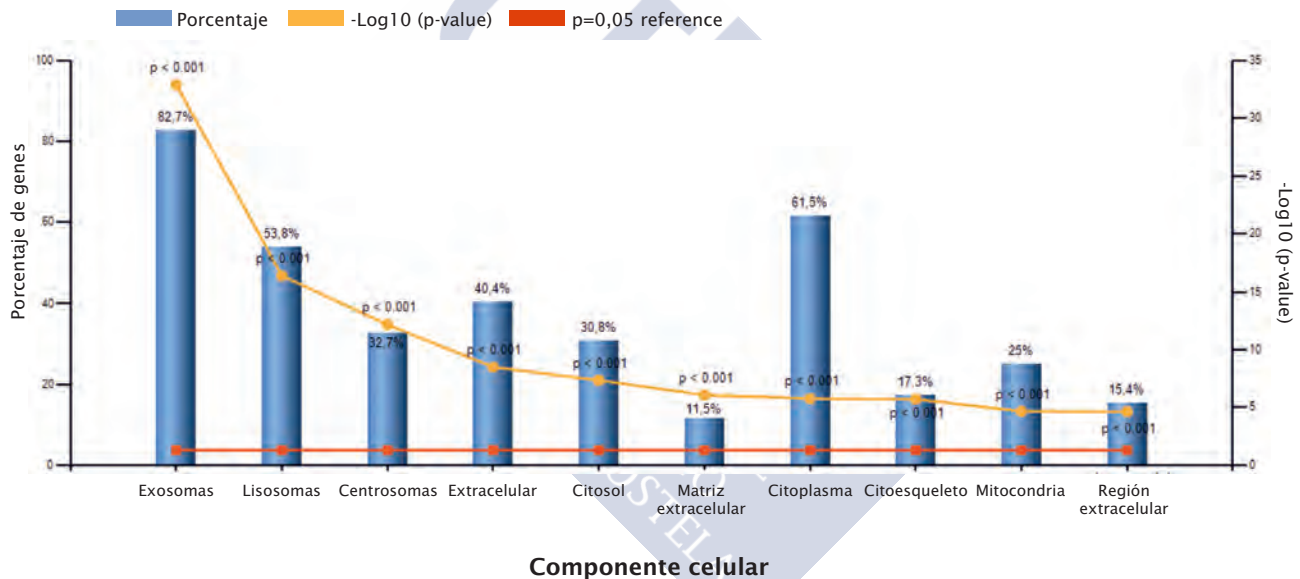
CÓDIGO ACCESO UNIPROT	NOMBRE	H:L	SecretomeP
A2MG_HUMAN	<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	0,2	PS
HSP74_HUMAN	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>	0,3	0.358
QSOX1_HUMAN	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>	0,3	0.611
KPYM_HUMAN	<i>Pyruvate kinase PKM</i>	0,3	0.420
GLCM_HUMAN	<i>Glucosylceramidase</i>	0,4	PS
HS90A_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>	0,5	0,173
ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>	0,5	0.505
HS90B_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>	0,5	0.204
ENPL_HUMAN	<i>Endoplasmin</i>	0,6	PS
ENOA_HUMAN	<i>Alpha-enolase</i>	0,6	0.536
4F2_HUMAN	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	0,6	0.644
HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	0,6	0.229
TBB5_HUMAN	<i>Tubulin beta chain</i>	0,7	0.526
TBA1C_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>	0,8	0.464
HEXA_HUMAN	<i>Beta-hexosaminidase</i>	0,8	PS
PMEL_HUMAN	<i>Melanocyte protein PMEL</i>	0,8	PS
ACTN1_HUMAN	<i>Alpha-actinin-1</i>	0,8	0.431
TBA1B_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	0,9	0.472
GRP75_HUMAN	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>	0,1	0.280
SFPQ_HUMAN	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	0,2	0.318
SORT_HUMAN	<i>Sortilin</i>	0,3	PS
AMD_HUMAN	<i>Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase</i>	0,3	PS
PABP1_HUMAN	<i>Polyadenylate-binding protein</i>	0,3	0.303
LYAG_HUMAN	<i>Lysosomal alpha-glucosidase</i>	0,5	PS
TYRP1_HUMAN	<i>5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase</i>	0,6	PS
TKT_HUMAN	<i>Transketolase</i>	0,6	0.368

CÓDIGO ACCESO UNIPROT	NOMBRE	H:L	SecretomeP
UBA1_HUMAN	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>	0,7	0.530
<b>OTRAS PROTEÍNAS SIN MARCAJE</b>			
DHX9_HUMAN	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>		0.270
EF2_HUMAN	<i>Elongation factor 2</i>		0.380
FLNA_HUMAN	<i>Filamin A</i>		0.449
PYGL_HUMAN	<i>Glycogen phosphorylase, liver form</i>		0.387
HBE_HUMAN	<i>Hemoglobin subunit epsilon</i>		0.472
K1C10_HUMAN	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>		0.123
K1C9_HUMAN	<i>Keratin, type I cytoskeletal 9</i>		0.108
K2C1_HUMAN	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>		0.099
LGI3_HUMAN	<i>Leucine-rich repeat LGI family member 3</i>		PS
LUM_HUMAN	<i>Lumican</i>		PS
PZP_HUMAN	<i>Pregnancy zone protein</i>		PS
CPVL_HUMAN	<i>Probable serine carboxypeptidase CPVL</i>		PS
ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>		PS
MMP11_HUMAN	<i>Stromelysin-3</i>		PS
TFR1_HUMAN	<i>Transferrin receptor protein 1</i>		0.425
VTNC_HUMAN	<i>Vitronectin</i>		PS

Tabla 14. Proteínas identificadas en los exosomas de OMM1 y OMM2.5 tras el marcaje SILAC. Se muestra la lista de proteínas identificadas por espectrometría de masas tras el aislamiento de exosomas en los secretomas de 48 horas de ambos tipos celulares. Las proteínas marcadas se ordenan de mayor a menor ratio de marcaje (H: L) donde OMM1 fueron cultivadas en presencia de aminoácidos marcados-Light [ $L$ - $[^{12}C6]$ -Lys/ $L$ - $[^{12}C6,^{14}N4]$ -Arg] y OMM2.5 con aminoácidos marcados-Heavy [ $L$ - $[^{13}C6]$ -Lys/ $L$ - $[^{13}C6,^{15}N4]$ -Arg]; a continuación se enumeran las proteínas identificadas que no presentaron marcaje. Se muestra el código de acceso al Uniprot (<http://www.uniprot.org/>), la identificación de la proteína, el nombre, el ratio de marcaje H: L, y la puntuación del Secretome P para la predicción de proteínas secretadas; las proteínas no secretadas clásicamente deben obtener un NN-score superior al umbral de 0,6.

La clasificación de todas las proteínas identificadas en los exosomas aislados de ambas líneas celulares muestra un alto porcentaje de proteínas exosomales (83%), y también extracelulares o de la matriz extracelular. Al igual que en el análisis de exosomas de UM-A, se encontraron proteínas del citoplasma y otros compartimentos intracelulares (Fig. 46).

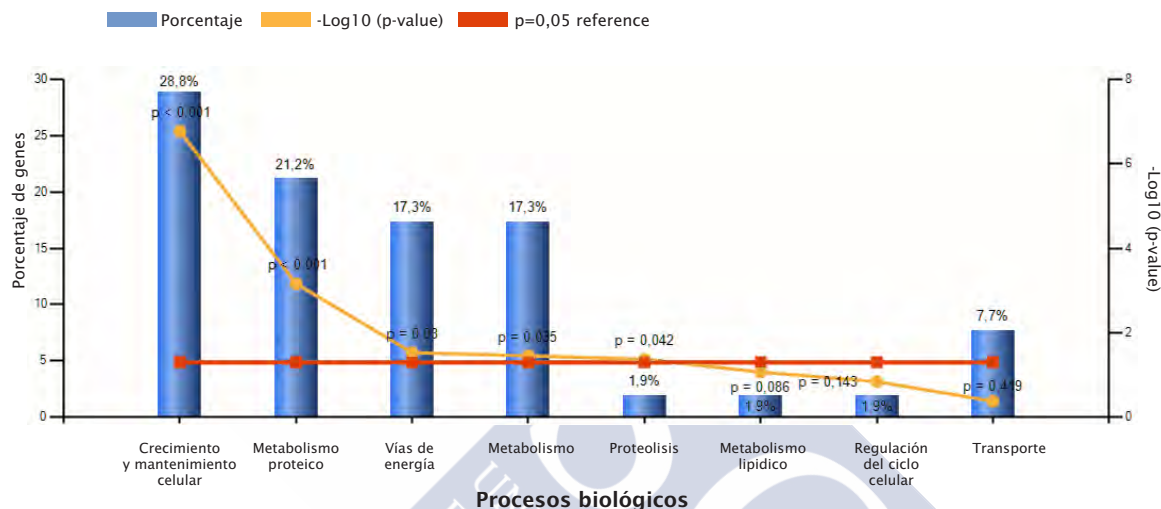
## Componente celular de todos los exosomas OMM1 y OMM2.5



**Figura 46. Componente celular de las proteínas identificadas en los exosomas secretados por las células OMM1 y OMM2.5. El gráfico muestra el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

Un análisis general de todas las proteínas identificadas en los exosomas de ambas líneas metastásicas muestra la presencia de proteínas implicadas en el crecimiento y mantenimiento celular, metabolismo, transporte e incluso en la regulación del ciclo celular (Fig. 47).

### Proceso biológico de todos los exosomas OMM1 y OMM2.5



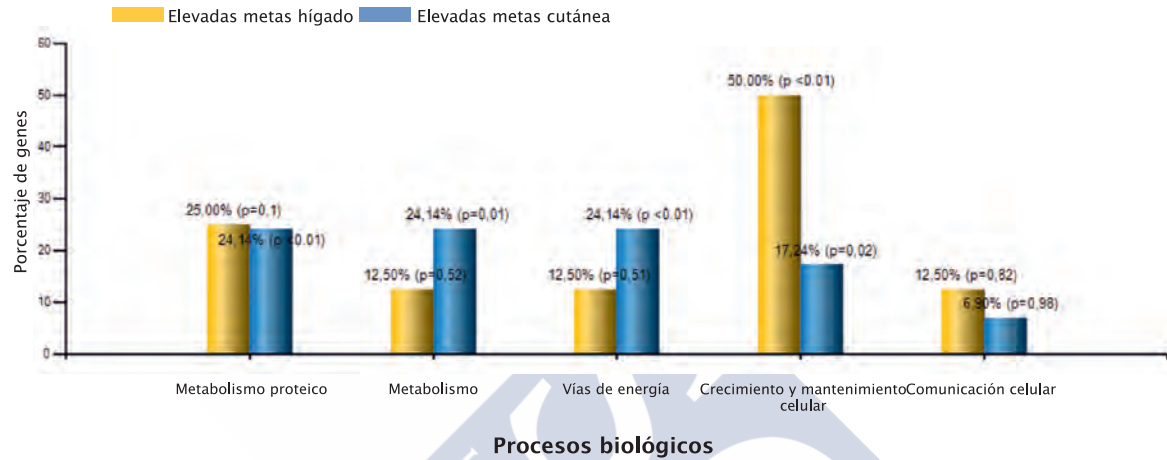
**Figura 47. Clasificación en cuanto al proceso biológico de las proteínas identificadas en los exosomas secretados por las células OMM1 y OMM2.5. El gráfico muestra el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor.**

Por otro lado, al comparar las proteínas elevadas en los exosomas de cada tipo celular se encontró que los exosomas procedentes de la metástasis hepática se caracterizaban por una mayor presencia de proteínas de crecimiento y mantenimiento celular, y también por proteínas de comunicación celular comparado con los exosomas de la metástasis cutánea (Fig. 48 A). En cuanto a las rutas biológicas, es interesante destacar que los exosomas de la metástasis cutánea contenían proteínas implicadas en la señalización de VEGF, señalización de proteoglicanos heparan sulfato, y en concreto syndecan-2, y de señalización a través del receptor de EGF y LKB1 (Fig. 48 B). Los exosomas de la metástasis hepática sin embargo presentaron niveles elevados de proteínas implicadas con las interacciones de superficie celular con la pared vascular y en las vías de señalización mediadas por syndecan-1 (Fig. 48 B).



A

## Procesos biológicos comparativa OMM2.5 (metástasis hígado) y OMM1 (metástasis cutáneas)



B

## Rutas biológicas comparativa OMM2.5 (metástasis hígado) y OMM1 (metástasis cutáneas)

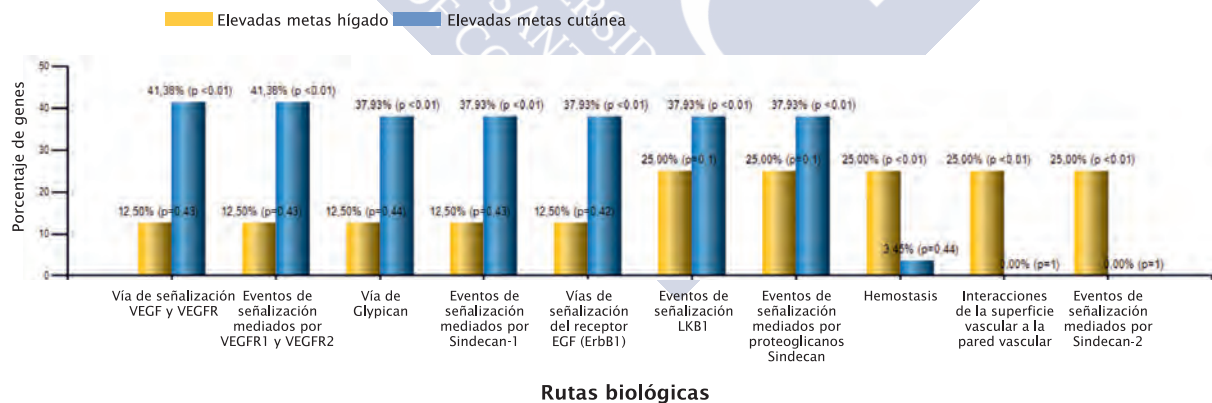


Figura 48. Clasificación en cuanto al proceso y ruta biológica de las proteínas identificadas en los exosomas secretados por las células OMM1 y OMM2.5. A. El histograma muestra el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor para el proceso biológico; B. se muestra la clasificación en cuanto a la ruta biológica.

#### 4.7. Los exosomas metastásicos presentan diferencias con los liberados por células del tumor primario.

Se realizó una comparativa de las proteínas identificadas en los exosomas liberados por UM-A y las líneas de melanoma uveal metastáticas. Teniendo en cuenta que la metodología varió en ambos análisis (se realizó un marcaje CILAIR en UM-A y un SILAC en OMM1/2.5), se puede observar que el tipo de proteínas identificadas varió en función de la células de origen. En la tabla 15 se muestran las 17 proteínas que se encontraron comunes a los tres tipos de exosomas. El análisis funcional de las proteínas comunes mostró que el 100% de las proteínas se clasificaban como presentes en exosomas (Fig. 50 A); en cuanto al proceso biológico se vieron mayoritariamente relacionadas con el crecimiento celular, regulación del ciclo celular, metabolismo, transporte y respuesta inmune entre otros (Fig. 50 B). En relación a las rutas biológicas, se observa la presencia de proteínas implicadas en la señalización a través de VEGF y su receptor, el factor de transcripción AP-1, integrinas, rutas de control del ciclo celular a través de CDC42, rutas mediadas por proteínas HDAC Clase II, mTOR, y ARF6 (Fig. 50 C).

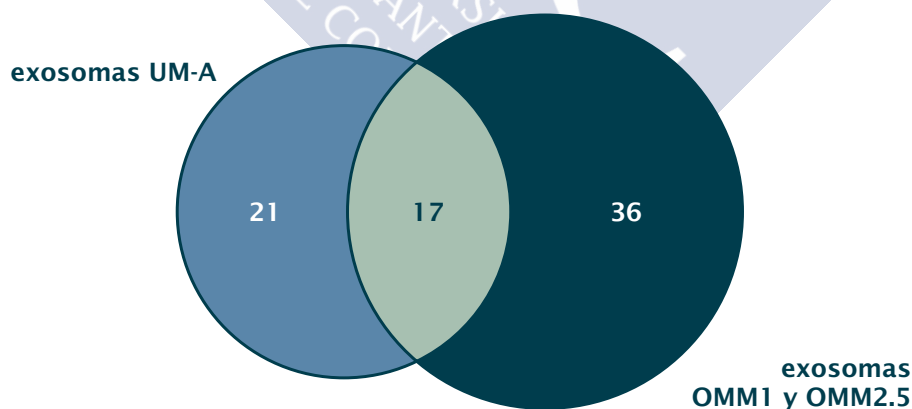


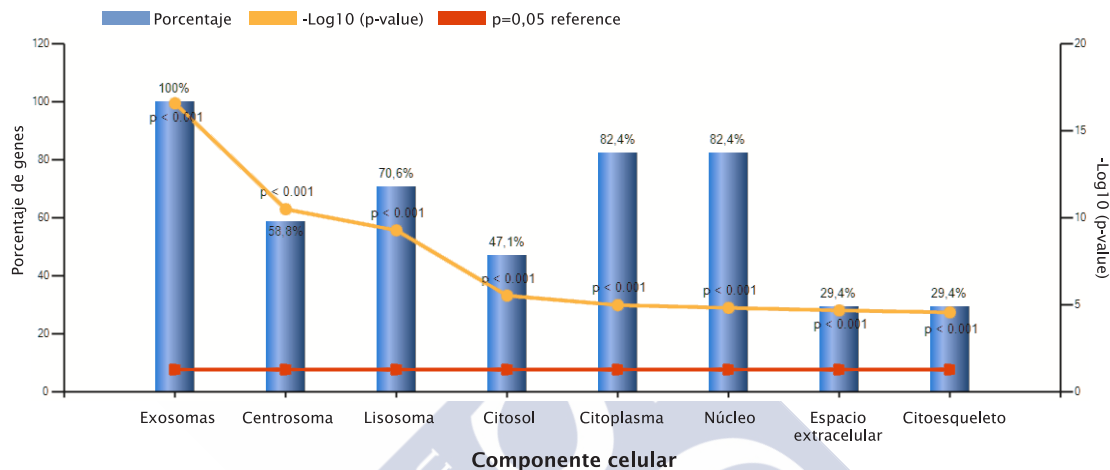
Figura 49. Diagrama de Venn mostrando las proteínas identificadas en los exosomas de UM-A tras marcaje CILAIR, y las líneas metastásicas OMM tras marcaje SILAC.

PROTEINAS COMUNES EXO OMM-UMA	
4F2_HUMAN	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>
ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 2</i>
ALBU_HUMAN	<i>Serum albumin</i>
FINC_HUMAN	<i>Fibronectin</i>
GRP75_HUMAN	<i>Stress-70 protein, mitochondrial</i>
HS90A_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>
HS90B_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-beta</i>
HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
K1C10_HUMAN	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>
K2C1_HUMAN	<i>Keratin, type II cytoskeletal 1</i>
KPYM_HUMAN	<i>Pyruvate kinase PKM</i>
LG3BP_HUMAN	<i>Galectin-3-binding protein</i>
QSOX1_HUMAN	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>
TBA1B_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>
TBA1C_HUMAN	<i>Tubulin alpha-1C chain</i>
TBB5_HUMAN	<i>Tubulin beta chain</i>
UBA1_HUMAN	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>

Tabla 15. Proteínas comunes a los exosomas aislados de UM-A, OMM1 y OMM2.5.

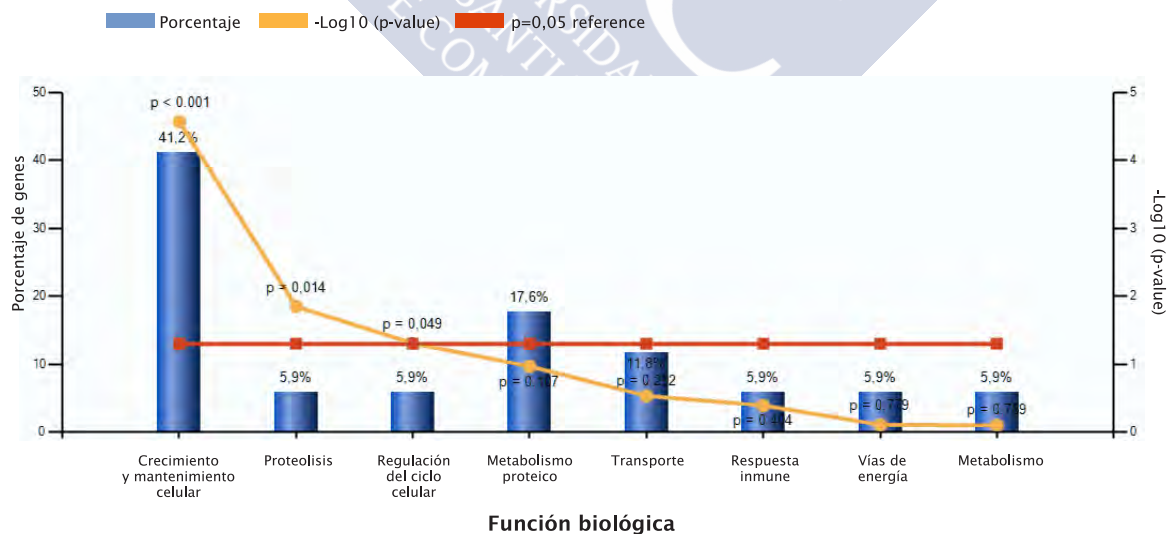
A

### Componente celular común exosomas UM-A y líneas metastásicas OMM1 y OMM2.5



B

### Funciones biológicas comunes exosomas UM-A y líneas metastásicas OMM1 y OMM2.5



C

## Rutas biológicas comunes exosomas UM-A y líneas metastásicas OMM1 y OMM2.5

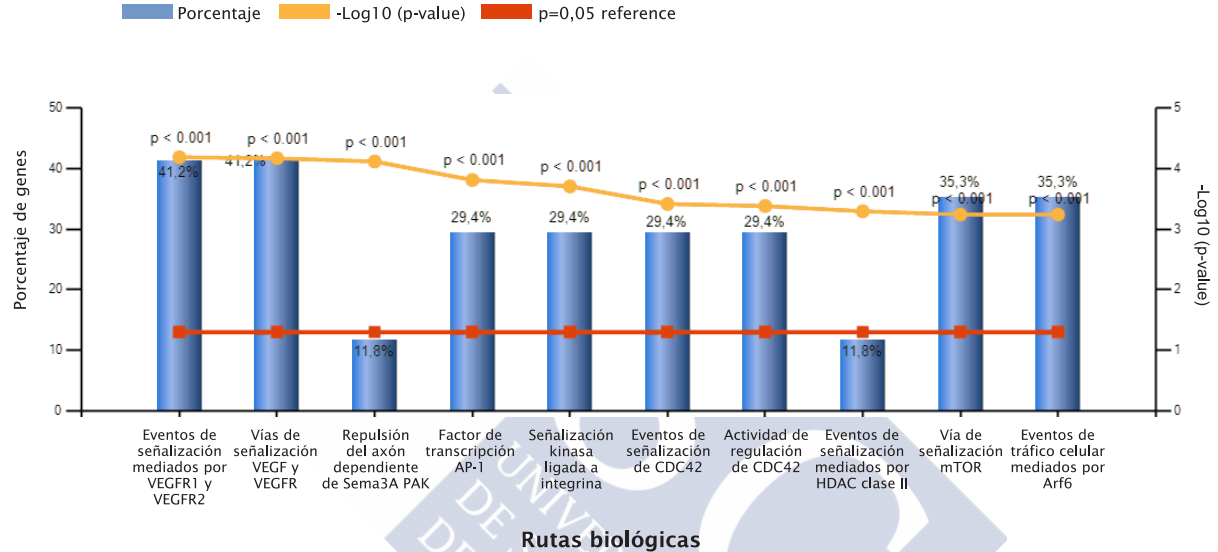


Figura 50. Proteínas comunes de exosomas UM-A y líneas metastásicas OMM1/OMM2.5. A: Perfil de componente celular. B: Función biológica. C: Clasificación en cuanto a la ruta biológica, los histogramas muestran el porcentaje de genes frente a la base de datos *Funrich* y p valor para el proceso biológico

## 5. Discusión

Está claro que los exosomas desempeñan un papel importante en la comunicación celular local y distalmente, actuando como señales autocrinas, paracrinas o endocrinas para promover el crecimiento del tumor, mantener la invasión cancerígena y promover las metástasis. Sin embargo en el MU, son escasos los trabajos que han estudiado este tipo de secreción celular <sup>241 242</sup> y hasta ahora ninguno se había realizado en cultivos celulares. Un trabajo previo de Pardo *et al.*, en 2007 y otro más reciente de Angi *et al.* donde se analiza y caracteriza por técnicas de proteómica el secretoma de líneas celulares y cultivos primarios respectivamente de MU, sugiere la secreción de exosomas en este tipo de tumor. <sup>229</sup> Sin embargo, la presente tesis es el primer trabajo donde se describe el aislamiento y caracterización de las vesículas liberadas por el MU hasta la fecha.

Además, en esta tesis doctoral, de manera innovadora se han empleado técnicas de marcaje cuantitativo de proteínas para la caracterización proteómica de los exosomas (SILAC y CILAIR); hasta la fecha apenas existe una referencia en la bibliografía mostrando esta aproximación metodológica al estudio de exosomas. <sup>252</sup> El marcaje de estas proteínas secretadas por esta vía no clásica, a través de exosomas, demuestra la utilidad de esta técnica para poder realizar estudios comparativos de vesículas extracelulares tumorales entre dos líneas celulares/tejidos tal y como se describe en esta tesis y en un único trabajo publicado donde se comparan exosomas en cáncer de pulmón. <sup>252</sup>

Los esfuerzos para caracterizar el contenido proteico de los exosomas hasta la fecha se han basado en técnicas de espectrometría de masas. Así se ha descrito que hay dos características en las proteínas en las VEs/exosomas: a) que existen proteínas estructurales comunes a la mayoría de los exosomas de manera independiente a la célula de origen y otras que son específicas; y b) que la composición proteica de los exosomas no siempre refleja enteramente el proteoma de la célula parental. Así, normalmente los exosomas reflejan un enriquecimiento de proteínas de la membrana plasmática, del compartimento endosomal y citosol en detrimento de otras proteínas como las

nucleares.<sup>253</sup> El perfil proteómico de los exosomas de melanoma uveal que se describe en los resultados, y en concreto el elevado número de proteínas citoplasmáticas/intreacelulares, es por tanto coherente con el contenido descrito en la bibliografía.

Teniendo en cuenta que las líneas celulares no son totalmente representativas de lo que ocurre en el tejido tumoral o en su metástasis, se plantea ahora realizar estudios futuros de aislamiento de exosomas a partir de cultivos de explantes tumorales, o quizás de cultivos primarios con pocos pasajes ya que probablemente la cantidad de proteína obtenida de tejido sea muy escasa dado el pequeño tamaño de la muestra tumoral que se puede obtener de MU en un globo ocular enucleado.

Otro planteamiento en el estudio de exosomas del MU sería intentar identificar estas microvesículas a nivel circulante, para valorar su utilidad como potenciales biomarcadores en pacientes afectados de esta enfermedad. De hecho, en este trabajo se ha encontrado que los exosomas liberados por las células en cultivo de MU contienen antígenos y proteínas de membrana ya conocidos y específicos de melanoma como MIA y PMEL, que han sido descritos previamente en sangre de pacientes,<sup>254,217</sup> y que permitiría aislar los exosomas específicos de melanoma uveal.

## 5.1. Análisis proteómico de secretomas y exosomas de las células de melanoma uveal en cultivo

En el análisis del secretoma de la línea celular UM-A se han encontrado proteínas con importantes funciones, como THSB-1 (*Thrombospondin-1*) relacionada con la adhesión celular y angiogénesis. Esta proteína, que también fue detectada en los exosomas de la línea celular UM-A, ya había sido estudiada en modelos animales de MU viendo como este inhibidor de la angiogénesis podría ejercer una acción en la disminución del crecimiento tumoral,<sup>255</sup> pudiendo servir como una estrategia terapéutica para el tratamiento de los

tumores.<sup>256</sup> Sin embargo, se han descrito acciones de esta proteína contradictorias en el cáncer, dependiendo su acción de la concentración de proteína, de la expresión del receptor en la célula tumoral o en el estroma asociado al tumor;<sup>256</sup> así se ha intentado desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a los receptores de THSB-1 para modular su acción.

En cuanto a CD44, presente en el secretoma y exosomas de UM-A, cabe destacar su implicación en las interacciones intercelulares y en la adhesión y migración celular. La sobre-expresión de CD44 ya se había descrito en MU,<sup>257</sup> y junto con la THSB-1 y otras proteínas, se sabe que ejerce su acción en el microambiente tumoral participando en el fenotipo tumoral después de la generación de los patrones de migración vascular característicos en el melanoma uveal.<sup>258</sup>

También se han encontrado proteínas relacionadas con la estructura celular y motilidad como las actinas y la moesina; esta última forma parte de las proteínas ERM (*Ezrin-Radixin-Moesin*) encargadas de organizar el citoesqueleto cortical mediante la unión de la actina filamentosa a la membrana apical de las células, y también de regular rutas de señalización.<sup>259</sup> Otras proteínas identificadas se han visto implicadas en la endocitosis y fusión de membranas, como CLTC (*Clathrin heavy chain*) y GDI2 (*Rab GDP dissociation inhibition*). Todas estas funciones concuerdan con la acción del secretoma y exosomas como medios de conexión y comunicación intercelular.

Pero también se han encontrado proteínas relacionadas con la síntesis y transcripción, enzimas metabólicas como la  $\alpha$ -Enolasa o GADPH, y también chaperonas; aunque todavía se desconoce el papel de estas proteínas en los exosomas del melanoma uveal. De hecho, las funciones atribuidas a cada proteína en la bibliografía están basadas en su función a nivel celular y no en su rol de proteína exosomal. Existen todavía pocos trabajos en la actualidad describiendo el papel concreto de proteínas exosomales; lo que enfatiza la necesidad de realizar un estudio más detallado de estas vesículas y su contenido.



Llama especialmente la atención, al analizar las proteínas detectadas en el secretoma y exosomas de UM-A, la presencia de proteínas ya implicadas en el melanoma como la *Melanoma-derived growth regulatory protein* MIA y *Melanocyte protein* PMEL. MIA ha sido descrita previamente en melanoma cutáneo como una molécula implicada en el desarrollo y progresión en este tumor; se ha encontrado presente en las células tumorales pero no en melanocitos normales,<sup>260,261</sup> por lo que se ha estudiado como una posible diana terapéutica en el melanoma cutáneo. Además, esta proteína se ha detectado elevada en el suero de pacientes de MU con metástasis, y por lo tanto ha sido considerada como un biomarcador en MU.<sup>262,254,263,264</sup>

En cuanto a la proteína PMEL (ME20M /gp100) y su forma soluble ME20-S, es una proteína estructural y específica para los melanomas; se ha descrito su liberación por proteólisis regulada por ectodominio, no sólo en la superficie celular, sino también a través de los exosomas.<sup>265</sup> En trabajos previos de Pardo *et al.* se ha descrito en el secretoma de las líneas celulares de MU y también en suero de pacientes la presencia de la forma soluble de esta proteína, ME20-S;<sup>135</sup> posteriormente en trabajos de Bande *et al.* se ha encontrado que los niveles de esta proteína en sangre de pacientes con MU, estaban más elevada en aquellos con enfermedad metastásica que en los tratados, pudiendo servir como un marcador precoz en el diagnóstico de la enfermedad invasiva.<sup>217</sup> Otra de las proteínas detectadas en el secretoma de la línea celular de MU, UM-A, ha sido SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine*), ya descrita previamente por Pardo *et al.* en el secretoma de líneas celulares de MU.<sup>135</sup> Trabajos posteriores en piezas histológicas de MU analizaron la expresión inmunohistoquímica de SPARC, detectando que los tumores con mayor expresión de SPARC presentaban un área mayor de vasos sanguíneos y un fenotipo epiteliode comparado con las piezas con menor expresión de esta; lo que sugiere que la participación de esta proteína de matriz en la formación de un lecho vascular que promueve la metastatización del tumor por vía hematógica.<sup>266</sup> Se ha estudiado la acción de SPARC en cultivos celulares *in vitro*, mediante la inhibición de la expresión con siRNA, demostrando la acción promotora de la proliferación celular de esta proteína.<sup>267</sup>

El antígeno CD98 o 4Ff2 (4F2 *Cell-surface antigen heavy chain*) es una glicoproteína de superficie, que se encuentra en los linfocitos activados, pero también en células tumorales independientemente de cual sea su origen.<sup>268,269,270</sup> Se encarga de regular el transporte de aminoácidos y la señalización por integrinas, que son claves en la señalización tumoral, además, se cree que la activación de la vía de PI3-kinasa podría explicar la transformación que sufren las células con sobreexpresión de CD98.<sup>271</sup> La descripción de este antígeno como marcador pronóstico se ha descrito en múltiples tumores, como el adenocarcinoma pulmonar,<sup>272,273</sup> tumores neuroendocrinos pulmonares,<sup>274</sup> en el carcinoma renal,<sup>275,276</sup> tumores de la vía biliar,<sup>277</sup> cáncer de mama,<sup>278</sup> tumores tímicos,<sup>279</sup> y en el melanoma cutáneo se ha descrito como un posible biomarcador.<sup>280</sup>

En cuanto al análisis funcional de las proteínas identificadas en el secretoma y exosomas de UM-A cabe destacar aquellas relacionadas con diversos aspectos del cáncer como el crecimiento o mantenimiento celular, regulación del ciclo celular, adhesión celular, angiogénesis a través de la señalización a través del factor de crecimiento endotelial vascular, y en concreto la vía de señalización mediada por *Syndecan*, promotora del crecimiento diseminación y angiogénesis tumoral como en el melanoma cutáneo.<sup>281,282</sup> Es interesante el hallazgo de proteínas de la familia de las integrinas y más concretamente de las beta integrinas en los exosomas de UM-A. Se ha descrito la presencia de diferentes integrinas en los exosomas tumorales asociadas al lugar diana de metástasis; así se ha descrito que las integrinas  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha 6\beta 1$  se relacionan con la metástasis en el pulmón, mientras que la integrina exosomal  $\alpha v\beta 5$  estaba implicada con la metástasis hepática. Al bloquear estas integrinas en los exosomas, se disminuye su integración en el tejido diana y la metástasis.<sup>283</sup> Sería interesante ahora, caracterizar la presencia de este tipo de integrinas en los exosomas de melanoma uveal e identificar posibles dianas inhibidoras de la diseminación hepática.

## 5.2. Análisis proteómico de los exosomas secretados por células de metástasis de melanoma uveal (cutánea y hepática)

Al analizar el proteoma de los exosomas liberados por las células de melanoma uveal metastático, OMM1 y OMM2.5, se encontró que difería significativamente con los exosomas procedentes de la línea establecida a partir del tumor primario UM-A. Sólo se encontraron 17 proteínas comunes a ambos tipos de exosomas, quizás por la diferente aproximación metodológica, pero también por el diferente origen celular tal y cómo se ha descrito previamente.<sup>253</sup>

Entre las proteínas encontradas en los exosomas de la línea OMM2.5 de metástasis hepática de MU se ha detectado ECM1 (*Extracellular matrix protein*), que es una proteína de la matriz extracelular relacionada con la angiogénesis y expresada en múltiples tumores; se ha postulado que niveles elevados de ECM1 producen un incremento de metástasis en tumores de origen epitelial.<sup>284</sup> Esta proteína se ha encontrado elevada en el carcinoma laríngeo con niveles superiores en los tumores metastásicos, por lo que se le atribuye una acción en la diseminación metastásica de este tumor;<sup>285</sup> también se ha descrito su acción en la migración e invasión en el colangiocarcinoma,<sup>286</sup> sus propiedades angiogénicas y su implicación en la progresión del cáncer de mama,<sup>287,288</sup> y su relación con la carcinogénesis y las metástasis linfáticas del cáncer gástrico.<sup>289</sup> Pero lo más relevante quizás de este hallazgo, es que ECM1 se encuentra entre uno de los quince genes estudiados en el test pronóstico de perfil de expresión en MU ya establecido por Harbour y colaboradores para la clasificación de los MU en bajo y alto grado de riesgo de metástasis.<sup>75</sup> Dado el reconocido papel de esta proteína en el MU, resulta reseñable que se encuentre como una de las proteínas presente en los exosomas de la línea metastásica hepática de MU; lo que refuerza la hipótesis de su implicación en el proceso de diseminación metastática del MU.<sup>75</sup> Con todo ello, el papel que pueda tener la presencia de ECM1 en los exosomas de melanoma uveal probablemente merezca un estudio más exhaustivo.

Otra proteína que llama la atención es *Ezrin* ya que se había descrito previamente como implicada en el desarrollo del MU. Esta proteína, relacionada con la migración y reconocimiento celular funcionando como nexo de unión entre la membrana plásmica y el citoesqueleto de actina,<sup>290</sup> se ha visto que está relacionada con una mayor mortalidad y con dos factores de alto riesgo en el melanoma uveal: la densidad microvascular, y el número de macrófagos infiltrados.<sup>291,292</sup> La identificación de esta proteína como elevada en la metástasis hepática en relación con la subcutánea podría indicar un papel en la formación del nicho metastático en este tejido.

Además, destaca entre otras, la presencia de nuevo de la proteína PMEL, en este caso identificada como elevada en los exosomas de la células de metástasis subcutánea, lo que sugiere su potencial uso como marcador no sólo del desarrollo primario del tumor, sino también su implicación en el proceso de diseminación y metástasis.

Al hacer un análisis funcional comparativo de las proteínas elevadas en los exosomas de las dos líneas metastáticas, se encontró que los exosomas de metástasis hepáticas presentaban mayor marcaje en las proteínas relacionadas con el mantenimiento y crecimiento celular, proteínas relacionadas con la señalización a través de *Syndecan-2*, y con la interacción entre la superficie celular y la pared vascular. Por otro lado, en la metástasis cutánea, se observa una elevación de proteínas de señalización a través de VEGF y su receptor, *Syndecan-1* y la vía de señalización a través del receptor de EGF. Todo ello sugiere la secreción de distintos exosomas con diferentes funciones en función de la célula de origen, y que el lugar de metástasis condiciona el contenido exosomal. Este carácter diferencial, podría ser de utilidad a la hora de monitorizar la presencia de exosomas de MU a nivel circulante como potenciales dianas terapéuticas y/o biomarcadores pronóstico para la monitorización de la evolución de la enfermedad así como del efecto del tratamiento.

Los marcadores exosomales identificados en esta tesis doctoral, de probarse su especificidad para el melanoma uveal, podrían ser unos buenos candidatos a ser

analizados mediante una sencilla biopsia líquida, permitiendo un tratamiento más personalizado para alcanzar un mejor pronóstico en los pacientes con melanoma uveal.







## Conclusiones

---





## Conclusiones

- Los tumores de coroides y las células de melanoma uveal en cultivo muestran una expresión elevada de la oncoproteína DJ-1. La inhibición de la expresión del gen PARK7, que codifica la expresión de DJ-1, provoca una disminución de la proliferación en las células de melanoma uveal en cultivo.
- La inhibición de la expresión de PARK7/DJ-1 en células de melanoma uveal muestra además una tendencia a la disminución de la migración en ensayos *in vitro*.
- Las células de melanoma uveal con la expresión PARK7/DJ-1 disminuida, mostraron alteraciones en la vía de señalización PI3K/Akt con un ligero aumento de PTEN y una disminución significativa de la forma fosforilada activa de Akt implicada en supervivencia celular.
- La inhibición de PARK7/DJ-1 se postula como una potencial diana terapéutica para el tratamiento del melanoma uveal.
- El estudio del perfil senescente en tumores de melanoma uveal mediante el análisis de p21, p16 y PTEN en cortes histológicos de globos oculares enucleados muestra diferentes grados de inmunorreactividad. El inhibidor del ciclo celular p21 se encontró ausente en el 61% de las piezas analizadas, y donde había señal, esta se encontraba con una positividad de tinción baja y con un pequeño porcentaje de células teñidas. En el caso del inhibidor p16, un 56% de los tumores presentaban positividad.
- El análisis del supresor tumoral PTEN, mostró una inmunorreactividad de una intensidad entre débil e intermedia en los cortes histológicos de melanoma uveal, pero la tinción se presentaba en un alto porcentaje de células.

- El análisis del marcador de proliferación Ki67 en los mismos pacientes mostró que la mitad de los tumores poseían tinción positiva.
- Estudios de correlación entre los diferentes marcadores muestra una relación entre p21 y PTEN encontrando que los pacientes con inmunorreactividad para p21 tienen más probabilidad de tener positividad para PTEN.
- Un análisis más global muestra que el tratamiento previo (braquiterapia/termoterapia) no afecta a la intensidad de tinción de los marcadores de senescencia en el melanoma uveal.
- El análisis de supervivencia de los pacientes estudiados no implica a ninguno de los marcadores senescentes salvo para el caso de PTEN donde se encuentra una correlación estadísticamente significativa y negativa entre la presencia de PTEN y la supervivencia. Aquellos pacientes con positividad para Ki67 mostraron una tendencia a presentar una menor supervivencia.
- El análisis proteómico de los secretomas de las células de melanoma uveal evidencia la presencia de un alto número de proteínas secretadas por la vía no convencional sin péptido señal.
- Las células de melanoma uveal en cultivo liberan al secretoma vesículas extracelulares de tipo exosomal con un tamaño medio de 100 nm y positivas para para CD9 y CD63.
- Las técnicas proteómicas de marcaje cuantitativo SILAC y CILAIR se demuestran útiles para el estudio comparativo de secretomas y vesículas extracelulares liberadas por líneas celulares establecidas a partir de tumores primarios y metástasis de MU.
- El análisis del proteoma de los exosomas liberados por las células de melanoma uveal muestra que estas vesículas portan marcadores específicos de melanoma como MIA y PMEL.

- El análisis proteómico comparativo de los exosomas liberados por la línea celular de tumor primario UM-A, y las líneas metastásicas OMM1 y OMM2.5, evidencia diferencias en función del tipo celular, y por tanto, del lugar de origen y metástasis.
- Los marcadores exosomales identificados podrían ser unos buenos candidatos a ser estudiados mediante biopsia líquida, permitiendo un mejor análisis pronóstico y un tratamiento más personalizado.







## Bibliografía

---



## Bibliografía

1. Patel, S. P. Latest developments in the biology and management of uveal melanoma. *Curr. Oncol. Rep.* **15**, 509–516 (2013).
2. Egan, K. M., Seddon, J. M., Glynn, R. J., Gragoudas, E. S. & Albert, D. M. Epidemiologic aspects of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol* **32**, 239–251 (1988).
3. Mahoney, M. C., Burnett, W. S., Majerovics, a & Tanenbaum, H. The epidemiology of ophthalmic malignancies in New York State. *Ophthalmology* **97**, 1143–1147 (1990).
4. Bergman, L. *et al.* Incidence of uveal melanoma in Sweden from 1960 to 1998. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2579–2583 (2002).
5. Weis, E., Shah, C. P., Lajous, M., Shields, J. a & Shields, C. L. The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. *Arch. Ophthalmol.* **124**, 54–60 (2006).
6. Singh, A. D., Bergman, L. & Seregard, S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin North Am* **18**, 75–84, viii (2005).
7. Shields, C. L., Shields, J. a & De Potter, P. Patterns of indocyanine green videoangiography of choroidal tumours. *Br. J. Ophthalmol.* **79**, 237–245 (1995).
8. Vine, A. *et al.* Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 1. *Arch. Ophthalmol.* **108**, 1268–73 (1990).
9. Singh, A. D. *et al.* Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo(dermal) melanocytosis. *Ophthalmology* **105**, 195–198 (1998).

10. Singh, A. D., Shields, C. L., Shields, J. A., Eagle, R. C. & De Potter, P. Uveal melanoma and familial atypical mole and melanoma (FAM-M) syndrome. *Ophthalmic Genet.* **16**, 53–61 (1995).
11. Specht, C. S. & Smith, T. W. Uveal malignant melanoma and von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Cancer* **62**, 812–817 (1988).
12. Singh, A. D., Damato, B., Howard, P. & Harbour, J. W. Uveal melanoma: genetic aspects. *Ophthalmol. Clin. North Am.* **18**, 85–97 (2005).
13. Abdel-Rahman, M. H. *et al.* Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J. Med. Genet.* **48**, 856–9 (2011).
14. Chattopadhyay, C. *et al.* Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 2299–2312 (2016). doi:10.1002/cncr.29727
15. Diener-West, M. *et al.* Screening for metastasis from choroidal melanoma: The Collaborative Ocular Melanoma Study Group Report 23. *J. Clin. Oncol.* **22**, 2438–2444 (2004).
16. Field, M. G. & Harbour, J. W. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **25**, 234–9 (2014).
17. Eskelin, S., Pyrhönen, S., Summanen, P., Hahka-Kemppinen, M. & Kivelä, T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: Tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* **107**, 1443–1449 (2000).
18. Triozzi, P. L. & Singh, A. D. Adjuvant Therapy of Uveal Melanoma: Current Status. *Ocul. Oncol. Pathol.* **1**, 54–62 (2015).
19. Gass, J. Problems in the differential diagnosis of choroidal nevi and malignant melanoma. *Am J Ophthalmol* 299–323 (1977). doi:10.1089/ten.2005.11.1254
20. Sumich, P., Mitchell, P. & Wang, J. J. Choroidal nevi in a white population: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **116**, 645–650 (1998).
21. Singh, A. D. & Topham, A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973–



1997. *Ophthalmology* **110**, 956–961 (2003).
22. Singh, A. D., Kalyani, P. & Topham, A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology* **112**, 1784–1789 (2005).
23. Shields, C. L., Shields, J. A., Kiratli, H., De Potter, P. & Cater, J. R. Risk factors for growth and metastasis of small choroidal melanocytic lesions. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **93**, 259 (1995).
24. Shields, C. L. *et al.* Combination of clinical factors predictive of growth of small choroidal melanocytic tumors. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 360–4 (2000).
25. Shields, C. L. *et al.* Choroidal nevus transformation into melanoma: analysis of 2514 consecutive cases. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **127**, 981–7 (2009).
26. Eskelin, S. & Kivelä, T. Mode of presentation and time to treatment of uveal melanoma in Finland. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 333–338 (2002).
27. Eagle Jr., R. C. *et al.* Inadvertent evisceration of eyes containing uveal melanoma. *Arch. Ophthalmol.* **127**, 141–145 (2009).
28. Albert, D. M. *et al.* Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the collaborative ocular melanoma study COMS report no. 6. *Am. J. Ophthalmol.* **125**, 745–766 (1998).
29. Badiyan, S. N. *et al.* Outcomes of iodine-125 plaque brachytherapy for uveal melanoma with intraoperative ultrasonography and supplemental transpupillary thermotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88**, 801–805 (2014).
30. *Melanoma Uveal. Guías de Práctica Clínica de la SERV.* (2016).
31. Fuchs, E. *Das Sarcom des Uvealtractus.* (1882).
32. Zimmerman, L. E., McLean, I. W. & Foster, W. D. Does enucleation of the eye containing a malignant melanoma prevent or accelerate the dissemination of tumour cells. *Br. J. Ophthalmol.* **62**, 420–5 (1978).
33. Shields, J. A. & Shields, C. L. Management of posterior uveal melanoma: past,

present, and future: the 2014 Charles L. Schepens lecture. *Ophthalmology* **122**, 414–28 (2015).

34. Group, C. O. M. S. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **124**, 1684–1693 (2006).
35. Singh, A. D. in *Oncología Clínica Oftálmica* 98–101 (2008).
36. Sagoo, M. S. *et al.* Plaque radiotherapy for juxtapapillary choroidal melanoma: Tumor control in 650 consecutive cases. *Ophthalmology* **118**, 402–407 (2011).
37. Sagoo, M. S. *et al.* Plaque radiotherapy for juxtapapillary choroidal melanoma: treatment complications and visual outcomes in 650 consecutive cases. *JAMA Ophthalmol.* **132**, 697–702 (2014).
38. Egger, E., Zoografos, L. & Goitein, G. in *Radiotherapy of intraocular and Orbital Tumours*, (ed. Springer\_Verlag) 68 (2003).
39. Langmann, G., Pendl, G., Klaus-Müllner, Papaefthymiou, G. & Guss, H. Gamma knife radiosurgery for uveal melanomas: an 8-year experience. *J. Neurosurg.* **93 Suppl 3**, 184–8 (2000).
40. Sarici, A. M. & Pazarli, H. Gamma-knife-based stereotactic radiosurgery for medium- and large-sized posterior uveal melanoma. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **251**, 285–294 (2013).
41. Mueller, A. J. *et al.* Stereotactic radiosurgery of large uveal melanomas with the gamma-knife. *Ophthalmology* **107**, 1381–1388 (2000).
42. Shields, C. L., Shields, J. A., Perez, N., Singh, A. D. & Cater, J. Primary transpupillary thermotherapy for small choroidal melanoma in 256 consecutive cases: Outcomes and limitations. *Ophthalmology* **109**, 225–234 (2002).
43. Oosterhuis, J. A., Journée-de Korver, H. G., Kakebeeke-Kemme, H. M. & Bleeker, J. C. Transpupillary thermotherapy in choroidal melanomas. *Arch. Ophthalmol.* **113**, 315–321 (1995).

44. Harbour, J. W., Meredith, T. A., Thompson, P. A. & Gordon, M. E. Transpupillary Thermotherapy versus Plaque Radiotherapy for Suspected Choroidal Melanomas. *Ophthalmology* **110**, 2207-2214 (2003).
45. Canal-Fontcuberta, I. *et al.* Clinical and Histopathologic Findings After Photodynamic Therapy of Choroidal Melanoma. *Retina* **32**, 942-948 (2012).
46. García-Arumí, J., Sararols, L., Martinez, V. & Corcostegui, B. Vitreoretinal surgery and endoresection in high posterior choroidal melanomas. *Retina* **21**, 445-52 (2001).
47. Caminal, J. M. *et al.* Endoresection versus iodine-125 plaque brachytherapy for the treatment of choroidal melanoma. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, (2013).
48. Garcia-Arumi, J. *et al.* Endoresection technique with/without brachytherapy for management of high posterior choroidal melanoma: extended follow-up results. *Retina* **35**, 628-637 (2015).
49. Shields, C. L., Kaliki, S., Furuta, M., Mashayekhi, A. & Shields, J. a. Clinical Spectrum and Prognosis of Uveal Melanoma Based on Age At Presentation in 8,033 Cases. *Retina* **32**, 1363-1372 (2012).
50. Rietschel, P. *et al.* Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8076-8080 (2005).
51. Zloto, O., Pe'er, J. & Frenkel, S. Gender differences in clinical presentation and prognosis of uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 652-6 (2013).
52. Shields, C. L. *et al.* Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **127**, 989-98 (2009).
53. Simpson, E. R. *et al.* International Validation of the American Joint Committee on Cancer's 7th Edition Classification of Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol.* **133**, 376-383 (2015).
54. Coupland, S. E., Campbell, I. & Damato, B. Routes of Extraocular Extension of Uveal Melanoma. Risk Factors and Influence on Survival Probability. *Ophthalmology* **115**,

1778-1785 (2008).

55. Damato, B. *et al.* Cytogenetics of Uveal Melanoma. A 7-Year Clinical Experience. *Ophthalmology* **114**, (2007).
56. McLean, M. J., Foster, W. D. & Zimmerman, L. E. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch. Ophthalmol.* **95**, 48-58 (1977).
57. Callender, G. Malignant melanotic tumors of the eye: A study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* **36**, 131-142 (1931).
58. Callender, G., Wilder, H. & Ash, J. Five hundred melanomas of the choroid and ciliary body followed five years or longer. *Am J Ophthalmol* **25**, 962-967 (1942).
59. Foss, A. J. E. *et al.* Microvessel count predicts survival in uveal melanoma. *Cancer Res.* **56**, 2900-2903 (1996).
60. McLean, I. W., Keefe, K. & Burnier, M. N. Uveal melanoma: comparison of the prognostic value of fibrovascular loops, mean of the ten largest nucleoli, cell type, and tumor size. *Ophthalmology* **104**, 777-780 (1997).
61. Mäkitie, T., Summanen, P., Tarkkanen, A. & Kivelä, T. Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. *J Natl Cancer Inst* **91**, 359-367 (1999).
62. De la Cruz, P. O., Specht, C. S. & McLean, I. W. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* **65**, 112-115 (1990).
63. Chen, X., Maniotis, A. J., Majumdar, D., Pe'er, J. & Folberg, R. Uveal melanoma cell staining for CD34 and assessment of tumor vascularity. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 2533-2539 (2002).
64. Al Jamal, R. & Kivelä, T. Ki-67 immunopositivity in choroidal and ciliary body melanoma with respect to nucleolar diameter and other prognostic factors. *Curr Eye Res* **31**, 57-67 (2006).
65. Bronkhorst, I. H. G. & Jager, M. J. Uveal melanoma: The inflammatory

microenvironment. *Journal of Innate Immunity* 4, 454–462 (2012).

66. Herwig, M. C. & Grossniklaus, H. E. Role of macrophages in uveal melanoma. *Expert Rev. Ophthalmol.* 6, 405–407 (2011).
67. Mäkitie, T., Summanen, P., Tarkkanen, A. & Kivelä, T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68+ cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1414–1421 (2001).
68. Prescher, G., Bornfeld, N. & Becher, R. Nonrandom Chromosomal Abnormalities in Primary Uveal Melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1765–1769 (1990).
69. Prescher, G. *et al.* Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 347, 1222–1225 (1996).
70. Schopper, V. J. & Correa, Z. M. Clinical application of genetic testing for posterior uveal melanoma. *Int. J. Retin. Vit.* 2–7 (2016). doi:10.1186/s40942-016-0030-2
71. Kilic, E. *et al.* Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3703–3707 (2006).
72. Ehlers, J. P., Worley, L., Onken, M. D. & Harbour, J. W. Integrative genomic analysis of aneuploidy in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* 14, 115–22 (2008).
73. Aalto, Y., Eriksson, L., Seregard, S., Larsson, O. & Knuutila, S. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 313–317 (2001).
74. Singh, A. D. & Damato, B. *Clinical ophthalmic oncology: Retinal tumors. Clinical Ophthalmic Oncology: Retinal Tumors* (2014). doi:10.1007/978-3-642-39489-8
75. Harbour, J. A Prognostic Test to Predict the Risk of Metastasis in Uveal Melanoma Based on a 15 Gene Expression Profile. *Methods Mol Biol* 1102, 45–69 (2014).
76. Vaarwater, J. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification equals fluorescence in-situ hybridization for the identification of patients at risk for metastatic disease in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 22, 30–7 (2012).

77. Damato, B., Dopierala, J. A. & Coupland, S. E. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin. Cancer Res.* **16**, 6083–92 (2010).
78. Damato, B. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma: correlation with metastatic death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 3048–55 (2009).
79. Field, M. G. *et al.* PRAME as an independent biomarker for metastasis in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1234–1242 (2016).
80. Onken, M. D. *et al.* Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* **119**, 1596–603 (2012).
81. William Harbour, J. & Chao, D. L. A molecular revolution in uveal melanoma: Implications for patient care and targeted therapy. *Ophthalmology* **121**, 1281–1288 (2014).
82. Damato, B. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification of uveal melanoma: Correlation with metastatic death. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 3048–3055 (2009).
83. Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
84. Lake, S. L., Kalirai, H., Dopierala, J., Damato, B. E. & Coupland, S. E. Comparison of Formalin-Fixed and Snap-Frozen Samples Analyzed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for Prognostic Testing in Uveal Melanoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 2647–2652 (2012).
85. Coupland, S. *et al.* Concordant chromosome 3 results in paired choroidal melanoma biopsies and subsequent tumour resection specimens. *The British journal of ophthalmology* **99**, 1444–1450 (2015).
86. Maat, W. *et al.* The heterogeneous distribution of monosomy 3 in uveal melanomas:

- Implications for prognostication based on fine-needle aspiration biopsies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **131**, 91–96 (2007).
87. Dopierala, J., Damato, B. E., Lake, S. L., Taktak, A. F. G. & Coupland, S. E. Genetic heterogeneity in uveal melanoma assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 4898–905 (2010).
  88. Field, M. G. & Harbour, J. W. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **25**, 234–9 (2014).
  89. Angi, M. Identification of biomarkers of metastatic disease in uveal melanoma using proteomics analyses. (University of Liverpool, 2015).
  90. Carvajal, R. D. *et al.* Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *Br. J. Ophthalmol.* bjophthalmol-2016-309034 (2016). doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309034
  91. Van Raamsdonk, C. D. *et al.* Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* **457**, 599–602 (2009).
  92. Davies, B. R. *et al.* AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical. *Mol Cancer Ther* **6**, 2209–2219 (2007).
  93. Roberts, P. J. & Stinchcombe, T. E. KRAS mutation: Should we test for it, and does it matter. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 1112–1121 (2013).
  94. Feng, X. *et al.* Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a Trio-regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell* **25**, 831–845 (2014).
  95. Yu, F. X. *et al.* Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell* **25**, 822–830 (2014).
  96. Field, M. G. & Harbour, J. W. GNAQ/11 mutations in uveal melanoma: Is YAP the key to targeted therapy? *Cancer Cell* **25**, 714–715 (2014).



97. Pan, H. *et al.* BAP1 regulates cell cycle progression through E2F1 target genes and mediates transcriptional silencing via H2A monoubiquitination in uveal melanoma cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **60**, 176–184 (2015).
98. Harbour, J. W. *et al.* Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* **330**, 1410–3 (2010).
99. Harbour, J. W. The genetics of uveal melanoma: An emerging framework for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 171–181 (2012).
100. Harbour, J. W. *et al.* Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nat. Genet.* **45**, 133–5 (2013).
101. Luscan, a *et al.* Uveal melanoma hepatic metastases mutation spectrum analysis using targeted next-generation sequencing of 400 cancer genes. *Br. J. Ophthalmol.* **99**, 437–9 (2015).
102. Martin, M. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat. Genet.* **45**, 933–936 (2013).
103. Mariani, P. *et al.* Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. *Eur. J. Surg. Oncol.* **35**, 1192–1197 (2009).
104. Frenkel, S. *et al.* Long-term survival of uveal melanoma patients after surgery for liver metastases. *Br. J. Ophthalmol.* **93**, 1042–1046 (2009).
105. Rivoire, M. *et al.* Treatment of liver metastases from uveal melanoma. *Ann. Surg. Oncol.* **12**, 422–428 (2005).
106. Bedikian, A. Y., Papadopoulos, N., Plager, C., Eton, O. & Ring, S. Phase II evaluation of temozolomide in metastatic choroidal melanoma. *Melanoma Res.* **13**, 303–6 (2003).
107. Schmitt, A. *et al.* A randomized phase II trial of gemcitabine plus treosulfan versus treosulfan alone in patients with metastatic uveal melanoma. *Ann. Oncol.* **17**, 1826–1829 (2006).
108. O'Neill, P. a, Butt, M., Eswar, C. V, Gillis, P. & Marshall, E. A prospective single arm



- phase II study of dacarbazine and treosulfan as first-line therapy in metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res.* **16**, 245–8 (2006).
109. Buder, K., Gesierich, A., Gelbrich, G. & Goebeler, M. Systemic treatment of metastatic uveal melanoma: review of literature and future perspectives. *Cancer Med.* **2**, 674–86 (2013).
  110. Ambrosini, G. *et al.* Identification of unique MEK-dependent genes in GNAQ mutant uveal melanoma involved in cell growth, tumor cell invasion, and MEK resistance. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3552–3561 (2012).
  111. Yang, Y. *et al.* Inactivation of Drosophila DJ-1 leads to impairments of oxidative stress response and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13670–13675 (2005).
  112. Lev, N., Roncevic, D., Ickowicz, D., Melamed, E. & Offen, D. Role of DJ-1 in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* **31**, 3017 (2007).
  113. Bitar, M. S. *et al.* Decline in DJ-1 and decreased nuclear translocation of Nrf2 in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 5806–5813 (2012).
  114. Shadrach, K. G., Rayborn, M. E., Hollyfield, J. G. & Bonilha, V. L. DJ-1-Dependent Regulation of Oxidative Stress in the Retinal Pigment Epithelium (RPE). *PLoS One* **8**, (2013).
  115. Cao, J., Lou, S., Ying, M. & Yang, B. DJ-1 as a human oncogene and potential therapeutic target. *Biochem. Pharmacol.* **93**, 241–250 (2015).
  116. Bonifati, V. *et al.* DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol. Sci.* **24**, 159–60 (2003).
  117. Rizzu, P. *et al.* DJ-1 Colocalizes with Tau Inclusions: A Link between Parkinsonism and Dementia. *Ann. Neurol.* **55**, 113–118 (2004).
  118. Devine, M. J., Plun-Favreau, H. & Wood, N. W. Parkinson's disease and cancer: two wars, one front. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 812–23 (2011).

119. Taira, T. *et al.* DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep.* **5**, 213–8 (2004).
120. Davidson, B. *et al.* Expression and clinical role of DJ-1, a negative regulator of PTEN, in ovarian carcinoma. *Hum. Pathol.* **39**, 87–95 (2008).
121. Zhu, X.-L. *et al.* DJ-1: a novel independent prognostic marker for survival in glottic squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **101**, 1320–5 (2010).
122. Liu, H. *et al.* Expression and role of DJ-1 in leukemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 477–83 (2008).
123. Yuen, H.-F. *et al.* DJ-1 could predict worse prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 3593–602 (2008).
124. Junn, E. *et al.* Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9691–9696 (2005).
125. Shinbo, Y., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M. & Ariga, H. DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3. *Int. J. Oncol.* **26**, 641–648 (2005).
126. Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W. & Ting, J. P. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15091–15096 (2006).
127. Bai, J. *et al.* DJ-1 may contribute to metastasis of non-small cell lung cancer. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 2697–703 (2012).
128. Kapoor, S. DJ-1 and its emerging role as a biomarker of systemic malignancies besides lung carcinomas. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 1529 (2013).
129. Naour, F. Le *et al.* Proteomics-based Identification of RS / DJ-1 as a Novel Circulating Tumor Antigen in Breast Cancer Proteomics-based Identification of RS / DJ-1 as a Novel Circulating Tumor Antigen in Breast Cancer 1 Franc. 3328–3335 (2001).

130. Kawate, T., Iwaya, K. & Kikuchi, R. DJ-1 protein expression as a predictor of pathological complete remission after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **139**, 51–9 (2013).
131. He, X., Liu, B. & YAO, W. Serum DJ-1 as a diagnostic marker and prognostic factor for pancreatic cancer. *J Dis Dig* **12**, 131–7 (2011).
132. He, X. *et al.* DJ-1 promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating SRC/ERK/uPA. *Carcinogenesis* **33**, 555–62 (2012).
133. Liu, S. *et al.* Increased DJ-1 and its prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. **57**, 1247–1256 (2010).
134. Pardo, M. *et al.* Proteome analysis of a human uveal melanoma primary cell culture by 2-DE and MS. *Proteomics* **5**, 4980–93 (2005).
135. Pardo, M., García, Á. & Antrobus, R. Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum. ... *proteome Res.* 2802–2811 (2007).
136. Pardo, M. *et al.* The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker. *Int. J. Cancer* **119**, 1014–22 (2006).
137. Bande, M. F. *et al.* Serum DJ-1/PARK 7 is a potential biomarker of choroidal nevi transformation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 62–7 (2012).
138. Chen, L.-L. *et al.* DJ-1: a promising marker in metastatic uveal melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* (2014). doi:10.1007/s00432-014-1804-2
139. Pardo, M. *et al.* Abnormal cell cycle regulation in primary human uveal melanoma cultures. *J. Cell. Biochem.* **93**, 708–20 (2004).
140. Zhu, X.-L., Wen, W.-P., Jiang, A.-Y., Lei, W.-B. & Su, Z.-Z. [Effect of RNA interference mediated gene silencing of DJ-1 on proliferation of laryngeal carcinoma cell line Hep-2]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* **43**, 374–378 (2008).

141. Raninga, P., Di Trapani, G., Vuckovic, S. & Tonissen, K. Targeted knockdown of DJ-1 induces multiple myeloma cell death via KLF6 upregulation. *Apoptosis* **21**, 1422–1437
142. Wang, H. & Gao, W. DJ-1 Expression in Cervical Carcinoma and its Effects on Cell Viability and Apoptosis. *Med Sci Monit* **21**, 2943–9
143. Zhang, G., He, C., Tao, L. & Liu, F. Role of DJ-1 siRNA in reverse sensitivity of breast cancer cells to chemotherapy and its possible mechanism. *Int J Clin Exp Pathol* **1**, 6944–51 (2015).
144. Nagakubo, D., Taira, T. & Kitaura, H. DJ-1, a Novel Oncogene Which Transforms Mouse NIH3T3 Cells in Cooperation with ras. *Biochem. ...* **513**, 509–513 (1997).
145. MICHALGRZMIL, S. Up-regulated expression of the MAT-8 gene in prostate cancer and its siRNA-mediated inhibition of expression induces a decrease in proliferation of human prostate. ... *J. Oncol.* **24**, 97–105 (2004).
146. Mackeigan, J. P. *et al.* Proteomic Profiling Drug-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Carcinoma: Identification of RS / DJ-1 and RhoGDI □ Proteomic Profiling Drug-Induced Apoptosis in Non-Small Cell Lung Carcinoma: *Cancer Res.* **63**, 6928–6934 (2003).
147. Melle, C. *et al.* Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker. *Clin. Chem.* **53**, 629–35 (2007).
148. Zhu, X.-L. *et al.* Tumorigenesis role and clinical significance of DJ-1, a negative regulator of PTEN, in supraglottic squamous cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31**, 94 (2012).
149. Zhu, Z., Li, Z. & Huang, Y. DJ-1 is involved in the peritoneal metastasis of gastric cancer through activation of the Akt signaling pathway. *Oncol. ...* 1489–1497 (2014). doi:10.3892/or.2013.2961
150. Zhu ZM, *et al.* *DJ-1 is involved in the peritoneal metastasis of gastric cancer through activation of the Akt signaling pathway.*

151. Li, Y. *et al.* High-expression of DJ-1 and loss of PTEN associated with tumor metastasis and correlated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* **10**, 1689-1697 (2013).
152. Qiu, B. *et al.* DJ-1 promotes development of DEN-induced hepatocellular carcinoma and proliferation of liver cancer cells. *Oncotarget* **27**,
153. Liu, S. *et al.* DJ-1 knockdown inhibits growth and xenograft-induced tumor generation of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **33**, 201-206 (2015).
154. Xu, S. *et al.* Dj-1 is upregulated in oral squamous cell carcinoma and promotes oral cancer cell proliferation and invasion. *J. Cancer* **7**, 1020-1028 (2016).
155. Zhang, S. *et al.* Novel association of DJ-1 with HER3 potentiates HER3 activation and signaling in cancer. *Oncotarget* **4:7**, 65758-65769
156. Lin, J. P. *et al.* DJ-1 is activated in medulloblastoma and is associated with cell proliferation and differentiation. *World J Surg Oncol* **12**, 373 (2014).
157. Yokota, T. *et al.* Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 1342-1348 (2003).
158. Kawate, T. *et al.* High levels of DJ-1 protein and isoelectric point 6.3 isoform in sera of breast cancer patients. *Cancer Sci.* **106**, 938-943 (2015).
159. Junn, E., Jang, W. H., Zhao, X., Jeong, B. S. & Mouradian, M. M. Mitochondrial localization of DJ-1 leads to enhanced neuroprotection. *J. Neurosci. Res.* **87**, 123-129 (2009).
160. Wang, B. *et al.* Effect of DJ-1 overexpression on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of laryngeal squamous cell carcinoma SNU-46 cells through PI3K/AKT/mTOR. *Oncol. Rep.* **32**, 1108-1116 (2014).
161. Pei, X. *et al.* Increased expression of macrophage migration inhibitory factor and DJ-1 contribute to cell invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Med*

*Sci* **22**, 106-115

162. Wei, W., Tang, C., Zhan, X., Yi, H. & Li, C. [Effect of DJ-1 siRNA on biological behavior of human lung squamous carcinoma SK-MES-1 cells]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban* **38**, 7-13 (2013).
163. Fang, M. *et al.* Role of DJ - 1 - induced PTEN down - regulation in migration and invasion of human glioma cells. *Chin. J. Cancer* **29**, 988-994 (2010).
164. Kim, R. H. *et al.* DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* **7**, 263-73 (2005).
165. Kim, R. H. *et al.* DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* **7**, 263-273 (2005).
166. Park, D. S., Lucio, J., Wah, T., Vasseur, S. & Afzal, S. DJ-1 / PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11111-6 (2009).
167. Fan, J. *et al.* DJ-1 decreases Bax expression through repressing p53 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 4022-4030 (2008).
168. Agilli, M., Cayci, T., Kurt, Y. G. & Aydin, F. N. Mutation analysis of the PTEN gene in uveal melanoma cell lines. *J. Toxicol. Sci.* **39**, 681 (2014).
169. Abdel-Rahman, M. H. *et al.* High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 288-95 (2006).
170. Sun, L. *et al.* MicroRNA-454 functions as an oncogene by regulating PTEN in uveal melanoma. *FEBS Lett.* **589**, 2791-2796 (2015).
171. Collado, M., Blasco, M. A. & Serrano, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* **130**, 223-233 (2007).
172. Muñoz-Espín, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104-18 (2013).

173. Collado, M. & Serrano, M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* **6**, 472–476 (2006).
174. Pérez-Mancera, P. A., Young, A. R. J. & Narita, M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 547–58 (2014).
175. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).
176. Lowe, S. W., Cepero, E. & Evan, G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* **432**, 307–15 (2004).
177. Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 51–57 (2010).
178. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9363–7 (1995).
179. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **113** ( Pt 2, 3613–3622 (2000).
180. Severino, J., Allen, R. G., Balin, S., Balin, a & Cristofalo, V. J. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp. Cell Res.* **257**, 162–171 (2000).
181. Burd, C. E. *et al.* Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16 INK4a-luciferase model. *Cell* **152**, 340–351 (2013).
182. Da Silva-Álvarez, S. & Collado, M. in *Encyclopedia of Cell Biology* (ed. Stahl, R. A. B. and P. D.) 511–517 (2016).
183. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* **88**, 593–602 (1997).
184. Gil, J. & Peters, G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 667–77 (2006).



185. Kim, W. & Sharpless, N. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* **197**, 265–275 (2006).
186. Lin, A. W. *et al.* Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**, 3008–3019 (1998).
187. Collado, M. *et al.* Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642 (2005).
188. Dankort, D. *et al.* A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. *Genes Dev.* **21**, 379–384 (2007).
189. Dhomen, N. *et al.* Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* **15**, 294–303 (2009).
190. Haferkamp, S. *et al.* Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 1983–1991 (2009).
191. Sears, R. C. & Nevins, J. R. Signaling Networks that Link Cell Proliferation and Cell Fate. *J. Biol. Chem.* **277**, 11617–11620 (2002).
192. Majumder, P. K. *et al.* A prostatic intraepithelial neoplasia-dependent p27 Kip1 checkpoint induces senescence and inhibits cell proliferation and cancer progression. *Cancer Cell* **14**, 146–55 (2008).
193. He, J. *et al.* Cell cycle suspension: a novel process lurking in G(2) arrest. *Cell Cycle* **10**, 1468–1476 (2011).
194. Wang, F. *et al.* Quantitative proteomic analysis for radiation-induced cell cycle suspension in 92-1 melanoma cell line. *J. Radiat. Res.* **54**, 649–62 (2013).
195. Zhang, X. *et al.* Both complexity and location of DNA damage contribute to cellular senescence induced by ionizing radiation. *PLoS One* **11**, (2016).
196. Coupland, S. E. *et al.* Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br. J.*



*Ophthalmol.* **82**, 961–70 (1998).

197. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.* (2013).
198. Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. Biometrika Trust An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Source Biometrika Biometrika Trust* **52**, 591–611 (1965).
199. Mann, H. B. & Whitney, D. R. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Stat.* **18**, 50–60 (1947).
200. Cramer, H. *Mathematical Methods of Statistics*. (Princeton University Press, 1946).
201. Fisher, R. a. The logic of inductive inference. *J. R. Stat. Soc.* **98**, 39–54 (1935).
202. Campisi, J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: Good citizens, bad neighbors. *Cell* **120**, 513–522 (2005).
203. Mouriaux, F. *et al.* Cyclin-dependent kinase inhibitory protein expression in human choroidal melanoma tumors. *Investig. Ophthalmol. {&} Vis. Sci.* **41**, 2837–2843 (2000).
204. Lamperska, K. *et al.* Expression of p16 in sporadic primary uveal melanoma. *Acta Biochim. Pol.* **49**, 377–385 (2002).
205. Zhang, X. *et al.* p21 is responsible for ionizing radiation-induced bypass of mitosis. *Biomed Env. Sci* **29**, 484–493 (2016).
206. Pe'er, J. *et al.* Cell proliferation activity in posterior uveal melanoma after Ru-106 brachytherapy: an EORTC ocular oncology group study. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 1208–1212 (2001).
207. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436**, 720–724 (2005).

208. Gray-Schopfer, V. C. *et al.* Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br. J. Cancer* **95**, 496–505 (2006).
209. Naumann, G., Yanoff, M. & Zimmerman, L. E. Histogenesis of malignant melanomas of the uvea. I. Histopathologic characteristics of nevi of the choroid and ciliary body. *Arch. Ophthalmol.* **76**, 784–96
210. Bass, S. J. & Sherman, J. Choroidal nevus transformation to malignant melanoma. *Clin. Eye Vis. Care* **10**, 41–43 (1998).
211. Pare, R., Yang, T., Shin, J.-S. & Lee, C. S. The significance of the senescence pathway in breast cancer progression. *J. Clin. Pathol.* **66**, 491–5 (2013).
212. Coupland, S. E., Lake, S. L., Zeschnigk, M. & Damato, B. E. Molecular pathology of uveal melanoma. *Eye (Lond)*. **27**, 230–42 (2013).
213. Collaud, S. *et al.* Lung neuroendocrine tumors: correlation of ubiquitinylation and sumoylation with nucleo-cytosolic partitioning of PTEN. *BMC Cancer* **15**, 74 (2015).
214. Trotman, L. C. *et al.* Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* **128**, 141–156 (2008).
215. Tyers, M., Tyers, M., Mann, M. & Mann, M. From genomics to proteomics. *Nature* **422**, 193–7 (2003).
216. Chiou, S.-H. & Wu, C.-Y. Clinical proteomics: current status, challenges, and future perspectives. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **27**, 1–14 (2011).
217. Bande, M. F. *et al.* ME20-S as a potential biomarker for the evaluation of uveal melanoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 7007–7011 (2015).
218. Zuidervaart, W. *et al.* Proteomic analysis of uveal melanoma reveals novel potential markers involved in tumor progression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **47**, 786–93 (2006).
219. Coupland, S. E. *et al.* Proteomics of uveal melanomas suggests HSP-27 as a possible surrogate marker of chromosome 3 loss. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 12–20 (2010).

220. Linge, A. *et al.* Differential expression of fourteen proteins between uveal melanoma from patients who subsequently developed distant metastases versus those who did not. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 4634–4643 (2012).
221. Ramasamy, P. *et al.* Proteomics in uveal melanoma. *Exp. Eye Res.* **118**, 1–12 (2014).
222. Van Vliet, C., Thomas, E. C., Merino-Trigo, A., Teasdale, R. D. & Gleeson, P. A. Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **83**, 1–45 (2003).
223. Nickel, W. & Rabouille, C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 148–155 (2008).
224. Villarreal, L. *et al.* Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes. *Mol. Cell. Proteomics* **12**, 1046–60 (2013).
225. Lin, Q., Tan, H. T., Lim, H. S. R. & Chung, M. C. M. Sieving through the cancer secretome. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 2360–2371 (2013).
226. Paltridge, J. L., Belle, L. & Khew-Goodall, Y. The secretome in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 2233–2241 (2013).
227. Caccia, D. *et al.* Secretome compartment is a valuable source of biomarkers for cancer-relevant pathways. *J. Proteome Res.* **10**, 4196–4207 (2011).
228. Makridakis, M. & Vlahou, A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Journal of Proteomics* **73**, 2291–2305 (2010).
229. Angi, M. *et al.* In-depth proteomic profiling of the uveal melanoma secretome. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.10418
230. Lo Cicero, A., Stahl, P. D. & Raposo, G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 69–77 (2015).
231. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: zyxosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).

232. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
233. Müller, G. Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* **5**, 247–282 (2012).
234. Li, X. B., Zhang, Z. R., Schluesener, H. J. & Xu, S. Q. Role of exosomes in immune regulation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10**, 364–375 (2006).
235. Kharaziha, P., Ceder, S., Li, Q. & Panaretakis, T. Tumor cell-derived exosomes: A message in a bottle. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1826**, 103–111 (2012).
236. Peinado, H. *et al.* Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **18**, 883–91 (2012).
237. Horstman, L. L. *et al.* Cell-Derived Microparticles and Exosomes in Neuroinflammatory Disorders. *International Review of Neurobiology* **79**, 227–268 (2007).
238. Belting, M. & Wittrup, A. Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: Implications in health and disease. *Journal of Cell Biology* **183**, 1187–1191 (2008).
239. Takata, A. *et al.* MicroRNAs and liver function. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica* **59**, 187–203 (2013).
240. Colombo, M., Raposo, G. & Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **30**, 255–89 (2014).
241. Eldh, M. *et al.* MicroRNA in exosomes isolated directly from the liver circulation in patients with metastatic uveal melanoma. *BMC Cancer* **14**, 962 (2014).
242. Ragusa, M. exosomes and serum from uveal melanoma patients : Pathological and diagnostic implications miRNA profiling in vitreous humor , vitreal exosomes and

- serum from uveal melanoma patients: Pathological and diagnostic implications. 1387–1396 (2016). doi:10.1080/15384047.2015.1046021
243. Brewis, I. A. & Brennan, P. Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* **80**, 1–44 (2010).
  244. Hoedt, E., Zhang, G. & Neubert, T. A. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) for quantitative proteomics. *Adv Exp Med Biol* **806**, 93–106 (2014).
  245. Roelofsen, H. *et al.* Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates (CILAIR) provides a quantitative method to study tissue secretomes. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 316–24 (2009).
  246. Bonzon-Kulichenko, E. *et al.* A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by <sup>18</sup>O labeling. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M110.003335 (2011).
  247. Perez-Hernandez, D. *et al.* The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* **288**, 11649–11661 (2013).
  248. Pathan, M. *et al.* FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *Proteomics* **15**, 2597–2601 (2015).
  249. Benito-Martin, A. & Peinado, H. FunRich proteomics software analysis, let the fun begin! *Proteomics* **15**, 2555–2556 (2015).
  250. Simpson, R. J., Jensen, S. S. & Lim, J. W. E. Proteomic profiling of exosomes : Current perspectives. (2008). doi:10.1002/pmic.200800109
  251. Momen-Heravi, F. *et al.* Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol. Chem.* **394**, 1253–1262 (2013).
  252. Clark, D. J., Fondrie, W. E., Yang, A. & Mao, L. Triple SILAC quantitative proteomic analysis reveals differential abundance of cell signaling proteins between normal and lung cancer-derived exosomes. *J. Proteomics* **133**, 161–169 (2016).

253. Iraci, N., Leonardi, T., Gessler, F., Vega, B. & Pluchino, S. Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
254. Reiniger, I. *et al.* 'Melanoma inhibitory activity' (MIA): a promising serological tumour marker in metastatic uveal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**, 1161–6
255. Wang, S., Neekhra, A., Albert, D. M., Sorenson, C. M. & Sheibani, N. Suppression of thrombospondin-1 expression during uveal melanoma progression and its potential therapeutic utility. *Arch. Ophthalmol.* **130**, 336–41 (2012).
256. Jeanne, A., Schneider, C., Martiny, L. & Dedieu, S. Original insights on thrombospondin-1-related antireceptor strategies in cancer. *Frontiers in Pharmacology* **6**, (2015).
257. Danen, E. H., ten Berge, P. J., van Muijen, G. N., Jager, M. J. & Ruiter, D. J. Expression of CD44 and the pattern of CD44 alternative splicing in uveal melanoma. *Melanoma Res* **6**, 31–35 (1996).
258. Folberg, R. *et al.* Tumor cell plasticity in uveal melanoma: microenvironment directed dampening of the invasive and metastatic genotype and phenotype accompanies the generation of vasculogenic mimicry patterns. *Am. J. Pathol.* **169**, 1376–1389 (2006).
259. Neisch, A. L. & Fehon, R. G. Ezrin, Radixin and Moesin: Key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 377–382 (2011).
260. Schmidt, J., Riechers, A. & Bosserhoff, A. K. MIA - A new target protein for malignant melanoma therapy. *Histology and Histopathology* **28**, 421–426 (2013).
261. Bosserhoff, A. K. Melanoma inhibitory activity (MIA): An important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Research* **18**, 411–416 (2005).
262. Schaller, U. C. *et al.* Melanoma inhibitory activity: a novel serum marker for uveal

- melanoma. *Melanoma Res.* **12**, 593–599 (2002).
263. Barak, V. *et al.* Serum markers to detect metastatic uveal melanoma. in *Anticancer Research* **27**, 1897–1900 (2007).
  264. Djukanovic, D., Hofmann, U., Sucker, A., Rittgen, W. & Schadendorf, D. Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Res.* **20**, 2203–2207 (2000).
  265. Hoashi, T., Tamaki, K. & Hearing, V. J. The secreted form of a melanocyte membrane-bound glycoprotein (Pmel17/gp100) is released by ectodomain shedding. *FASEB J.* **24**, 916–30 (2010).
  266. Ordóñez, J. L. *et al.* Differential expression of angioregulatory extracellular matrix proteins in posterior uveal melanoma. *Melanoma Res.* **15**, 495–502 (2005).
  267. Maloney, S. C. *et al.* SPARC is expressed in human uveal melanoma and its abrogation reduces tumor cell proliferation. *Anticancer Res.* **29**, 3059–64 (2009).
  268. Cantor, J. M. & Ginsberg, M. H. CD98 at the crossroads of adaptive immunity and cancer. *J. Cell Sci.* **125**, 1373–1382 (2012).
  269. Hara, K., Kudoh, H., Enomoto, T., Hashimoto, Y. & Masuko, T. Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of early lymphocyte activation antigen CD98. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 720–5 (1999).
  270. M., P. & I.M., H. Controlling tumor-derived and vascular endothelial cell growth: role of the 4F2 cell surface antigen. *Am. J. Pathol.* **159**, 165–178 (2001).
  271. Ip, H. & Sethi, T. CD98 signals controlling tumorigenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **81**, 148–150 (2016).
  272. Kaira, K. *et al.* Prognostic significance of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) and 4F2 heavy chain (CD98) expression in surgically resectable stage III non-small cell lung cancer. *Exp. Ther. Med.* **1**, 799–808 (2010).
  273. Kaira, K. *et al.* CD98 expression is associated with poor prognosis in resected non-small-cell lung cancer with lymph node metastases. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 3473–



3481 (2009).

274. Kaira, K. *et al.* Expression of 4F2hc (CD98) in pulmonary neuroendocrine tumors. *Oncol. Rep.* **26**, 931–937 (2011).
275. Prager, G. W. *et al.* CD98hc (SLC3A2), a novel marker in renal cell cancer. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**, 304–310 (2009).
276. Poettler, M. *et al.* CD98hc (SLC3A2) drives integrin-dependent renal cancer cell behavior. *Mol. Cancer* **12**, 1–12 (2013).
277. Kaira, K., Sunose, Y., Oriuchi, N., Kanai, Y. & Takeyoshi, I. CD98 is a promising prognostic biomarker in biliary tract cancer. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* **13**, 654–657 (2014).
278. Furuya, M., Horiguchi, J., Nakajima, H., Kanai, Y. & Oyama, T. Correlation of L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression with triple negative breast cancer prognosis. *Cancer Sci.* **103**, 382–389 (2012).
279. Kaira, K. *et al.* CD98 expression is associated with the grade of malignancy in thymic epithelial tumors. *Oncol. Rep.* **24**, 861–7
280. Theodosakis, N. *et al.* Integrative discovery of CD98 as a melanoma biomarker. *Pigment Cell Melanoma Res.* **29**, 385–7 (2016).
281. Ramani, V. C. *et al.* The heparanase/syndecan-1 axis in cancer: Mechanisms and therapies. *FEBS Journal* **280**, 2294–2306 (2013).
282. Lee, J. H. *et al.* Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 27167–27175 (2009).
283. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–35 (2015).
284. Sercu, S., Zhang, L. & Merregaert, J. The extracellular matrix protein 1: its molecular interaction and implication in tumor progression. *Cancer Invest.* **26**, 375–84 (2008).
285. Gu, M. *et al.* Correlation of ECM1 expression level with the pathogenesis and



- metastasis of laryngeal carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **6**, 1132–1137 (2013).
286. Xiong, G. P., Zhang, J. X., Gu, S. P., Wu, Y. B. & Liu, J. F. Overexpression of ECM1 contributes to migration and invasion in cholangiocarcinoma cell. *Neoplasma* **59**, 409–415 (2012).
  287. Han, Z. *et al.* Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J.* **15**, 988–994 (2001).
  288. Lal, G. *et al.* Extracellular matrix 1 (ECM1) expression is a novel prognostic marker for poor long-term survival in breast cancer: a Hospital-based Cohort Study in Iowa. *Ann Surg Oncol* **16**, 2280–2287 (2009).
  289. Wu, Q. *et al.* Extracellular matrix protein 1 is correlated to carcinogenesis and lymphatic metastasis of human gastric cancer. *World J. Surg. Oncol.* **12**, 132 (2014).
  290. Vaheri, A. *et al.* The ezrin protein family: Membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 659–666 (1997).
  291. Mallikarjuna, K., Pushparaj, V., Biswas, J. & Krishnakumar, S. Expression of epidermal growth factor receptor, ezrin, hepatocyte growth factor, and c-Met in uveal melanoma: an immunohistochemical study. *Curr. Eye Res.* **32**, 281–90 (2007).
  292. Mäkitie, T., Carpén, O., Vaheri, A. & Kivelä, T. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 2442–2449 (2001).





Anexos



## Anexo I

### Expresión proteica por inmunohistoquímica

		KI67.CELULAS			Total
		0	1	2	
KI67.INTENSIDAD	0	24	0	0	24
	1	0	6	0	6
	2	0	4	0	4
	3	0	8	4	12
Total		24	18	4	46

Tabla A1.1. Tabla de contingencia KI67.INTENSIDAD frente a KI67.CELULAS

		P21.CÉLULAS			Total
		0	1	2	
P21.INTENSIDAD	0	29	0	0	29
	1	0	8	0	8
	2	0	3	3	6
	3	0	4	0	4
Total		29	15	3	47

Tabla A1.2. Tabla de contingencia P21.INTENSIDAD vs P21.CÉLULAS

		P16.CÉLULAS				Total
		0	1	2	3	
P16. INTENSIDAD	0	8	0	0	0	8
	1	0	6	4	0	10
	2	0	2	10	6	18
	3	0	0	3	7	10
Total		8	8	17	13	46

Tabla A1.3. Tabla de contingencia P16.INTENSIDAD vs P16.CÉLULAS

		PTEN.CÉLULAS				Total
		0	1	2	3	
PTEN.INTENSIDAD	0	10	0	0	0	10
	1	0	4	3	15	22
	2	0	0	1	9	10
	3	0	0	0	4	4
Total		10	4	4	28	46

Tabla A1.4. Tabla de contingencia PTEN. INTENSIDAD vs PTEN.CÉLULAS

		DJ1. CÉLULAS			Total
		0	1	3	
DJ1 .INTENSIDAD	0	2	0	0	2
	1	0	1	1	2
	2	0	0	9	9
	3	0	0	34	34
Total		2	1	44	47

Tabla A1.5. Tabla de contingencia DJ1. INTENSIDAD vs DJ1.CÉLULAS

## Relación entre los distintos biomarcadores

### 1. Correlación entre Ki67 y DJ-1

		ScoreKI67		Total
		0	1	
ScoreDJ1	0	2	1	3
	1	31	12	43
Total		33	13	46

Tabla A1.6: tabla de contingencia para las variables de score de Ki67 y DJ1

No hay evidencia de una posible relación entre las variables Ki67 y DJ1 ( $p$  0,641)

### 2. Correlación entre Dj-1 y p21

		ScoreP21		Total
		0	1	
ScoreDJ1	0	3	0	3
	1	27	17	44
Total		30	17	47

Tabla A1.7: tabla de contingencia para las variables de score de DJ1 y p21

Los resultados no son significativos ( $p$  0,292), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables.

### 3. Correlación entre DJ-1 y p16

		ScoreP16		Total
		0	1	
ScoreDJ1	0	2	1	3
	1	18	25	43
Total		20	26	46

**Tabla A1.8: Tabla de contingencia score DJ-1 y p16**

Los resultados no son significativos ( $p$  0,572), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables.

### 4. Correlación entre PTEN y DJ-1

		ScoreDJ1		Total
		0	1	
ScorePTEN	0	2	15	17
	1	1	28	29
Total		3	43	46

**Tabla A1.9: Tabla de contingencia score DJ-1 y PTEN**

Los resultados no son significativos ( $p$  0,545), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables.



## 5. Correlación entre Ki67 y p21

		ScoreP21		Total
		0	1	
ScoreKI67	0	22	11	33
	1	7	6	13
Total		29	17	46

**Tabla A1.10: Tabla de contingencia score Ki67 y p21**

Los resultados no son significativos ( $p = 0,505$ ), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables.

## 6. Correlación entre Ki67 y p16

		ScoreP16		Total
		0	1	
ScoreKI67	0	14	18	32
	1	5	8	13
Total		19	26	45

**Tabla A1.11: Tabla de contingencia score Ki67 y p16**

Los resultados no son significativos ( $p = 1$ ), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables

## 7. Correlación entre Ki67 y PTEN

		ScorePTEN		Total
		0	1	
ScoreKI67	0	13	19	32
	1	4	9	13
Total		17	28	45

**Tabla A1.12: Tabla de contingencia score Ki67 y PTEN**

Los resultados no son significativos ( $p = 0,737$ ), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables

## 8. Correlación entre p21 y p16

		ScoreP16		Total
		0	1	
ScoreP21	0	16	13	29
	1	4	13	17
Total		20	26	46

**Tabla A1.13: Tabla de contingencia score p21 y p16**

Los resultados no son significativos ( $p = 0,37$ ), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables

## 9. Correlación entre p16 y PTEN

t		ScorePTEN		Total
		0	1	
ScoreP16	0	7	13	20
	1	10	16	26
Total		17	29	46

Tabla A1.14: Tabla de contingencia score PTEN y p16

Los resultados no son significativos ( $p = 0,527$ ), es decir, no hay evidencias de una posible relación entre las variables

## 10. Correlación entre p21 y PTEN

t		ScorePTEN		Total
		0	1	
ScoreP21	0	14	14	28
	1	3	15	18
Total		17	29	46

Tabla A1.15: Tabla de contingencia score PTEN y p21

Existe una relación de intensidad moderada entre PTEN y p21, ( $V = 0,337$ ), ( $p = 0,03$ )



## Anexo II

PROTEÍNAS COMUNES SECRETOMA Y EXOSOMAS UM-A		
Código acceso Uniprot	ID PROTEINA	NOMBRE
Q08380	LG3BP_HUMAN	<i>Galectin-3-binding protein (Tumor-associated antigen 90K)</i>
P02751	FINC_HUMAN	<i>Fibronectin (FN)</i>
P07996	TSP1_HUMAN	<i>Thrombospondin-1</i>
P16070	CD44_HUMAN	<i>CD44 antigen</i>
P07093	GDN_HUMAN	<i>Glia-derived nexin (GDN)</i>
P11142	HSP7C_HUMAN	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>
O43707	ACTN4_HUMAN	<i>Alpha-actinin-4</i>
P26038	MOES_HUMAN	<i>Moesin</i>
P14618	KPYM_HUMAN	<i>Pyruvate kinase PKM (Tumor M2-PK)</i>
Q00610	CLH1_HUMAN	<i>Clathrin heavy chain 1</i>
P22314	UBA1_HUMAN	<i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>
P41250	SYG_HUMAN	<i>Glycine--tRNA ligase</i>
P07900	HS90A_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-alpha</i>
P63261	ACTG_HUMAN	<i>Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)</i>
O00391	QSOX1_HUMAN	<i>Sulfhydryl oxidase 1</i>
P08238	HS90B_HUMAN	<i>Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 90)</i>
P38646	GRP75_HUMAN	<i>Stress-70 protein</i>
P07942	LAMB1_HUMAN	<i>Laminin subunit beta-1</i>

Tabla A2.1: Proteínas comunes secretoma y exosoma UM-A

PROTEÍNAS SOLO EXOSOMAS UM-A		
Código acceso	Uniprot	ID PROTEINA
		NOMBRE
P08195	4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain (CD antigen CD98)
Q15758	AAAT_HUMAN	Neutral amino acid transporter B
O15240	VGF_HUMAN	Neurosecretory protein VGF
Q9BQE3	TBA1C_HUMAN	Tubulin alpha-1C chain
P68363	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain
P02768	ALBU_HUMAN	Serum albumin
P04264	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1
P13645	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10
P35908	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
P07437	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)
P05023	AT1A1_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
P02042	HBD_HUMAN	Hemoglobin subunit delta
Q08431	MFGM_HUMAN	Lactadherin (Breast epithelial antigen BA46)
P00750	TPA_HUMAN	Tissue-type plasminogen activator (t-PA)
P08572	CO4A2_HUMAN	Collagen alpha-2(IV) chain
Q9Y4L1	HYOU1_HUMAN	Hypoxia up-regulated protein 1
P13929	ENOB_HUMAN	Beta-enolase
Q03169	TNAP2_HUMAN	Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2
Q7KZF4	SND1_HUMAN	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
Q8N144	CXD3_HUMAN	Gap junction delta-3 protein (Connexin-31.9)

Tabla A2.2. Proteínas exclusivas de exosomas UM-A